

LA FIJACION SIMBIOTICA DEL DINITROGENO UNA REVISION GENERAL (*)

A.M. Gutiérrez-Navarro(1) , M.A. León-Barrios (1) y J. Corzo (2)

Departamentos de Microbiología y Biología Celular(1) y de Bioquímica y Biología Molecular (2).

Universidad de La Laguna. La Laguna. 38206 Tenerife

El nitrógeno es el elemento más abundante de la biosfera y constituye una parte importante (entre el 8 y el 10 por ciento) de la materia viva. En los suelos se encuentra en forma combinada y con frecuencia es el factor limitante para el crecimiento de los vegetales y, por consiguiente, para la productividad de los ecosistemas. Por el contrario, en el estado de dinitrógeno es extremadamente abundante en la atmósfera terrestre (constituye el 76 por ciento en peso del aire) por lo que podría ser considerado *a priori* como una fuente prácticamente inagotable de este elemento. Ahora bien, debido a la estructura de su molécula, se trata de un gas extraordinariamente inerte y, por ello, no es utilizable por los seres vivos con la única excepción de un conjunto de procariotas capaces de fijarlo, es decir, de transformarlo hasta una forma metabolizable por otros organismos.

1. Microorganismos fijadores de nitrógeno

La actividad fijadora de nitrógeno consiste en la reducción del dinitrógeno de la atmósfera hasta amoníaco:



El amoníaco producido es luego incorporado a esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados, y ello hace que los organismos capaces de efectuar esta actividad puedan vivir en ausencia de nitrógeno combinado y sintetizar sus materiales nitrogenados a expensas, exclusivamente, del nitrógeno que hay en la atmósfera. Es una actividad que está catalizada por un sistema enzimático, el complejo nitrogenasa, que solamente se encuentra en un grupo de seres vivos.

(*) Dada la categoría y profundidad con que ha sido tratado el tema de esta revisión, el Comité Editorial ha considerado de gran interés incluir este trabajo en esta Sección.

todos ellos procarióticos, que reciben el nombre de **diazotrofos** y que cada vez se va viendo más ampliado. En la actualidad se conocen 80 géneros de eubacterias (Tabla 1) y 6 de arqueobacterias (Tabla 2) que incluyen una o más especies diazotrofas.

Tabla 1 Clasificación de las eubacterias diazotrofas.

Grupos fisiológicos	Géneros y número (entre paréntesis) de especies diazotrofas
Heterotrofas	
Aerobias	
Azotobacteriaceae	<i>Azotobacter</i> (6), <i>Azomonas</i> (3), <i>Beijerinckia</i> (4), <i>Derxia</i> (1), <i>Xanthobacter</i> (3)
Acetobacteriaceae	<i>Acetobacter</i> (2)
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> (6)
Methylomonadaceae	<i>Methylosinus</i> (2), <i>Methylocystis</i> (1), <i>Methylococcus</i> (4), <i>Methylobacter</i> (1), <i>Methylomonas</i> (2), <i>Microcycus</i> (4), <i>Renobacter</i> (1).
Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i> (5), <i>Bradyrhizobium</i> (1), <i>Azorhizobium</i> (1), <i>Photorhizobium</i> (1), <i>Agrobacterium</i> (1)
Spirillaceae	<i>Azospirillum</i> (5), <i>Herbaspirillum</i> (1), <i>Aquaspirillum</i> (4), <i>Campylobacter</i> (1)
Beggiatoaceae	<i>Beggiatoa</i> (1)
Actinomycetes	<i>Frankia</i> (1)
Afiliación dudosa	<i>Alcaligenes</i> (3), <i>Thiobacillus</i> (1)
Anaerobias facultativas	
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> (2), <i>Klebsiella</i> (4), <i>Enterobacter</i> (3), <i>Erwinia</i> (1)
Vibrionaceae	<i>Vibrio</i> (4)
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> (3)
Afiliación dudosa	<i>Mycoplana</i> (2)
Anaerobias	
Bacillaceae	<i>Clostridium</i> (12), <i>Desulfotomaculum</i> (3)
Afiliación dudosa	<i>Desulfovibrio</i> (7), <i>Desulfobacter</i> (4)
Fototrofas	
Anoxigénicas	
Rhodospirillaceae	<i>Rhodobacter</i> (5), <i>Rhodopseudomonas</i> (7), <i>Rhodospirillum</i> (5), <i>Rhodopila</i> (1), <i>Rhodomicrobium</i> (1), <i>Rhodocycus</i> (2)
Chromatiaceae	<i>Chromatium</i> (7), <i>Lamprobacter</i> (1), <i>Thiocystis</i> (1), <i>Thiocapsa</i> (2), <i>Amoebobacter</i> (1)
Ectothiorhodospiraceae	<i>Ectothiorhodospira</i> (2)
Chlorobiaceae	<i>Chlorobium</i> (4), <i>Chloroherpeton</i> (1), <i>Pelodyction</i> (1), <i>Prosthechloris</i> (1)
Chloroflexaceae	<i>Chloroflexus</i> (1)
Afiliación dudosa	<i>Helibacterium</i> (1)
Oxigénicas	
Chroococcaceae	<i>Gloeotheca</i> (1)
Nostocaceae	<i>Anabaena</i> (12), <i>Anabaenopsis</i> (1), <i>Aphanizomenon</i> (1), <i>Aulorisa</i> (1), <i>Chlorogloea</i> (1), <i>Cylindrospermum</i> (4), <i>Gloeotrichia</i> (1), <i>Nodularia</i> (1), <i>Nostoc</i> (8), <i>Trichodesmium</i> (1)
Rivulariaceae	<i>Calothrix</i> (5)
Scytonemataceae	<i>Scytonema</i> (2), <i>Tolypothrix</i> (1)
Oscillatoriaceae	<i>Oscillatoria</i> (1), <i>Plectonema</i> (1), <i>Schizothrix</i> (1)
Stigonemataceae	<i>Fischerella</i> (2), <i>Haploosiphon</i> (1), <i>Mastigocladus</i> (1), <i>Stigonema</i> (1), <i>Westliopsis</i> (1)

Tabla 2 Clasificación de las arqueobacterias diazotrofas

Grupos fisiológicos	Géneros y número (entre paréntesis) de especies diazotrofas
Metanógenas	
Methanococcales	<i>Methanococcus</i> (5)
Methanobacteriales	<i>Methanobacterium</i> (3)
Methanomicrobiales	<i>Methanobolus</i> (1), <i>Methanosarcina</i> (1)
Methanothermaceae	<i>Methanothermus</i> (2)
Halófilas	
Halobacteriaceae	<i>Halobacterium</i> (1)

Algunos diazotrofos solamente pueden fijar el nitrógeno atmosférico en simbiosis con plantas pertenecientes a varias familias vegetales. Son los denominados fijadores simbióticos del nitrógeno, que se agrupan fundamentalmente en cuatro géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Frankia*. Las restantes bacterias diazotrofas se denominan fijadores libres del nitrógeno y son de fisiología diversa. Entre ellas, las hay fototrofas oxigénicas (algunos géneros de cianobacterias) y anoxigénicas como algunas especies de *Rhodospseudomonas*, *Rhodobacter* o *Chromatium*. Entre las organotrofas las hay anaerobias facultativas (pertenecen a este grupo, por ejemplo, algunas especies de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Erwinia*, *Vibrio* o *Bacillus*), anaerobias estrictas, como las pertenecientes al género *Clostridium*, y aerobias estrictas, como las de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia* y *Dexia*, así como algunas estirpes de *Pseudomonas* y de metilobacterias. También hay arqueobacterias diazotrofas como las metanógenas y *Halobacterium halobium* (Tabla 2), lo que sugiere que estamos ante una actividad metabólica de origen evolutivo muy antiguo, quizás más que la propia fotosíntesis, y ello podría explicar también la extrema sensibilidad al oxígeno que presenta la nitrogenasa.

La principal limitación que tiene la fijación libre del nitrógeno se deriva del hecho comentado de que el complejo nitrogenasa no es activo en condiciones aerobias y solamente funciona cuando está debidamente protegido del oxígeno gaseoso; así se explica que las bacterias facultativas fijen el nitrógeno atmosférico sólo cuando son cultivadas en anaerobiosis. En el caso de los diazotrofos aerobios la protección de la nitrogenasa se logra, entre otros mecanismos, mediante una intensa actividad respiratoria que impide el acceso del oxígeno a los lugares en los que radica el complejo enzimático. Pero ello exige el consumo de ingentes cantidades de materia orgánica que ha de ser utilizada como sustrato respirable para llevar a cabo dicha protección de la nitrogenasa. Además, el proceso fijador del nitrógeno es muy endérgico y, en consecuencia, para que tenga lugar, son necesarias grandes cantidades de ATP que se obtienen también mediante la respiración de materia orgánica; se calcula que la reducción de un mol de dinitrógeno consume, como mínimo, 16 moles de ATP. De esta pequeña discusión cabe deducir que es poco probable la existencia en los suelos de semejantes cantidades de materia orgánica, lo que limita considerablemente el papel de la fijación libre del nitrógeno, al menos en los suelos de climas templados (mayor importancia

puede tener en las zonas tropicales, en las que los aportes de residuos vegetales a los suelos son mayores). Por otra parte, el complejo nitrogenasa se inhibe por el amonio, producto de su actividad catalítica sobre la molécula de dinitrógeno y, por esta razón, es poco probable que las bacterias fijadoras libres puedan acumular en su citoplasma cantidades de amonio suficientes como para ser excretadas al suelo, lo que indica que el posible nitrógeno liberado como consecuencia de la fijación libre lo sería casi exclusivamente en forma orgánica, no asimilable directamente por los vegetales, que, como es sabido, asimilan el nitrógeno en las formas amónica y nítrica. Por ello, ha de sufrir varias transformaciones, también efectuadas por bacterias: en primer lugar, la mineralización libera amonio que es oxidado, primero a nitritos y después a nitratos. En todos estos procesos se produce la inmovilización del nitrógeno, ya que la microflora que lo transforma también lo utiliza como nutriente para su propio crecimiento.

2. Fijación simbiótica del nitrógeno: introducción

Todos los problemas señalados se soslayan en el caso de la fijación simbiótica del dinitrógeno: en primer lugar, el aporte de materia orgánica lo efectúa la propia planta hospedadora, mediante su actividad fotosintética; el fotosintato es transportado hasta el sitio de fijación y allí oxidado por la bacteria para obtener el ATP necesario para el funcionamiento del complejo nitrogenasa. Además, el amoníaco producido en el proceso fijador es rápidamente incorporado en los esqueletos carbonados, también suministrados por la actividad fotosintética del hospedador, lo que impide la inhibición de la nitrogenasa a que antes aludíamos. Por último, el producto final de la fijación del nitrógeno (generalmente, amidas, ureidos o aminoácidos) es utilizado directamente por la planta. Esto justifica el hecho de que, desde el punto de vista cuantitativo, la fijación simbiótica del nitrógeno tenga mayor importancia que la fijación libre. Así, según datos de Mishustin y Shil'nikova [240], la fijación libre efectuada por las cianobacterias supone una cantidad de 22 kilogramos de nitrógeno por hectárea y año; a *Azotobacter* son atribuibles 0,26 kilogramos por hectárea y año y a *Clostridium*, 0,22. Sin embargo, una hectárea de terreno bien abonado en el que se cultiva alfalfa en simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* fija cada año una cantidad de nitrógeno equivalente a más de 264 kilogramos; en el caso del trébol, se fijan en las mismas condiciones unos 220 kilogramos y en el del altramuza, unos 132 kilogramos. No es extraño, pues, que la mayor parte de los trabajos publicados en relación con la fijación del nitrógeno atmosférico se refieran a los procesos de fijación simbiótica.

Hace unos 2.000 años en la época de la Roma antigua, era conocido y se utilizaba el hecho de que las leguminosas contribuyen a mantener la fertilidad de los suelos. Por ello, se convirtió en una práctica agrícola habitual la rotación de cultivos de leguminosas y trigo. Como tantas otras cosas, esta práctica cayó

en el olvido en la oscura Edad Media y no fue redescubierta hasta mediados del siglo XVIII en el condado de Norfolk (Inglaterra) porque como señalaba Sir Humphrey Davey en 1.813 "*Los guisantes y las judías parecen especialmente adaptados para preparar los suelos para el cultivo del trigo*".

Este sistema rotacional de cultivos se extendió pronto al Continente y permitió la estabilización agrícola y la liberación de mano de obra del campo, que, junto con las teorías económicas de Malthus, hicieron posible la revolución industrial acaecida en el siglo XIX en la Europa Occidental.

Sin embargo, esta capacidad de las leguminosas no se relacionó con la presencia de nódulos en las raíces de estas plantas, que había sido ya descrita en 1.675 por Malpighi, hasta que en 1.838 Boussingault demostró de una manera clara que las leguminosas fijaban el nitrógeno de la atmósfera y, cincuenta años más tarde, Hellriegel y Wilfarth demostraron que sólo pueden hacerlo las que poseen nódulos radicales.

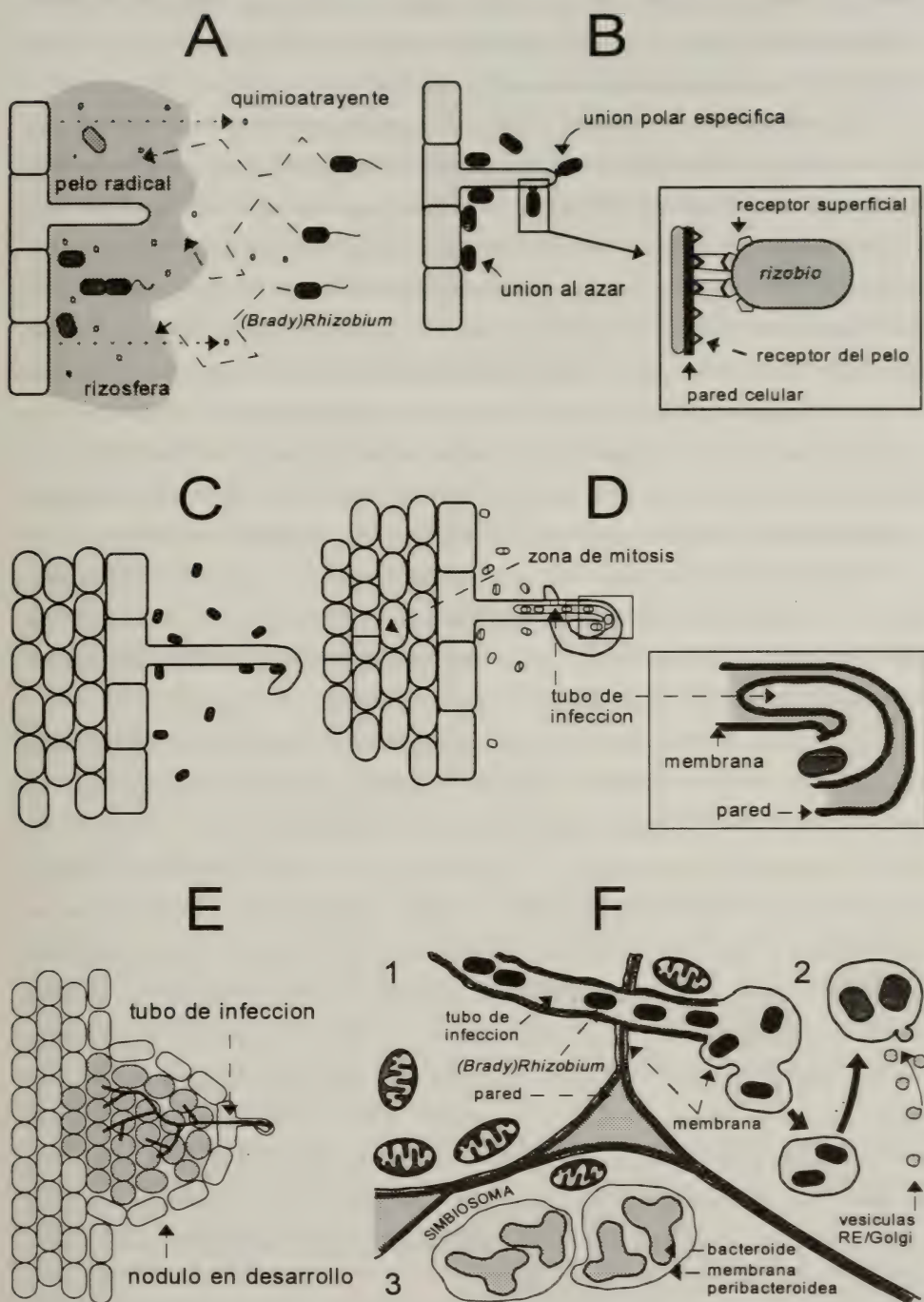
El aislamiento del primer diazotrofo simbiótico fue realizado en 1.888 por Beijerinck. Hasta entonces se creía que la fijación del nitrógeno en los nódulos de las leguminosas se efectuaba en unos orgánulos, denominados "bacteroides" que, supuestamente, se formaban *de novo* en las células del nódulo. Beijerinck demostró que, en realidad, dichos bacteroides son consecuencia de una serie de cambios que experimenta una bacteria del suelo que infecta la raíz, a la que denominó *Bacillus radicicola* y actualmente es conocida como *Rhizobium leguminosarum*. Desde entonces se han ido aislando nuevos diazotrofos simbióticos, la mayoría de los cuales lo son con leguminosas, lo que confiere a esta simbiosis su importancia cuantitativa. En efecto, debe tenerse en cuenta que el de las leguminosas (Familia Fabaceae) es uno de los grupos vegetales más numerosos, formado por unos 700 géneros y 14.000 especies. De ellas, hay unas cien de importancia agrícola que se cultivan en una superficie total de 250 millones de hectáreas y suponiendo una fijación media de 140 kg de nitrógeno por hectárea y año, se puede calcular que la simbiosis permite una entrada a los suelos de 35 millones de toneladas de nitrógeno al año en todo el Planeta.

Como queda dicho, las bacterias que efectúan una fijación simbiótica del nitrógeno se agrupan en sólo cuatro géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Frankia*. Este último es simbiótico con plantas de diversas familias, pero los tres primeros sólo pueden establecer la simbiosis con leguminosas (la única planta perteneciente a otra familia que puede establecer simbiosis con un miembro de las Rhizobiaceae es *Parasponia*, planta leñosa de la familia Ulmaceae, que es infectada por *Bradyrhizobium*). Dado que la distinción entre *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* data de hace unos doce años [179] y que el aislamiento de *Azorhizobium* es aun más reciente [124], los primeros trabajos que hacen relación a ellos se refieren solamente al género *Rhizobium* y en lo que sigue, cuando se utilice el término "rizobio" estará referido indistintamente a uno u otro género.

3. El proceso de infección de las leguminosas por los rizobios

El establecimiento de la simbiosis es un proceso complicado que implica la interacción entre ambos simbioses. De forma esquemática puede ser representado como en la Figura 1. La relación simbiótica comienza cuando los rizobios son atraídos quimiotácticamente por los exudados radicales de la planta hospedadora [82,123,137] y, como consecuencia de ello, proliferan abundantemente en su rizosfera. Cuando están próximos a la raíz, los rizobios se unen a las células superficiales (pelo radical y células epidérmicas) por mecanismos no bien conocidos, aunque posiblemente impliquen la interacción de macromoléculas complementarias. Así las lectinas presentes en la raíz de la leguminosa podrían unirse a componentes específicos de la superficie del rizobio. Las fibrillas de celulosa producidas por *Rhizobium* pueden ayudar a esta unión al favorecer que la bacteria quede atrapada en la superficie de la raíz [193]. Por otra parte, esta unión podría favorecerse por las **ricadesinas** (proteínas que ligan Ca^{2+} específicas de las Rhizobiaceas). Si bien hay consenso sobre el papel de las lectinas en esta unión, mayor controversia existe sobre el componente polisacárido superficial del rizobio que las reconoce [26,68]. Así, para algunos autores son las propias fibrillas de celulosa [193]; para otros, los polisacáridos extracelulares o capsulares [66,67] y para otros, en fin, los lipopolisacáridos de la pared [188,220,384]. Nosotros disponemos de una colección de rizobios aislados de leguminosas endémicas del Archipiélago Canario, que, pese a tener la misma gama de hospedadores, muestran polisacáridos extracelulares de diferente composición química [208,209]. De cualquier forma, sean o no responsables del reconocimiento inicial, los componentes superficiales del rizobio parecen desempeñar una importante función en la simbiosis y son numerosos los trabajos que aportan datos que avalan esta afirmación y las descripciones de mutantes no infectivos, cuyos polisacáridos no difieren de los de la estirpe parental infectiva [17,249,315]. También se ha observado que las mutaciones que afectan a cualquiera de los componentes polisacáridos superficiales de los rizobios pueden alterar su fenotipo simbiótico. Así, los mutantes *eps*⁻ (incapaces de sintetizar polisacáridos normales) difieren en sus capacidades simbióticas con diferentes plantas: una misma mutación induce un fenotipo Nod⁻ o Inf⁻ en plantas de *Pisum*, *Medicago* y *Leucaena*, pero no afecta al fenotipo simbiótico sobre

Figura 1. Estadios en la infección de la raíz de una leguminosa por diazotrofos simbioses. A. La bacteria es atraída mediante quimiotaxis a la rizosfera del vegetal y prolifera en ella. B. Se produce una adsorción específica de la bacteria al pelo radical de la planta. C. El pelo sufre una incurvación característica quedando algunas bacterias atrapadas en la zona incurvada. D. Se produce una invaginación de la pared y la membrana del pelo radical, para formar el tubo de infección que avanza a través de las células corticales del vegetal (E), ramificándose. Simultáneamente se induce un foco de proliferación celular formándose el primordio del nódulo. F. Representación esquemática de un corte de un nódulo maduro. 1. Célula no infectada, atravesada por el tubo de infección que contiene bacterias indiferenciadas; 2. Proceso de infección de la célula vegetal por liberación de vesículas por invaginación de la membrana citoplasmática y fusión con vesículas procedentes del aparato de Golgi, del retículo endoplásmico o de ambos; los rizobios se diferencian al estado de bacteroide; 3. Célula infectada que contiene los bacteroides alojados en simbiosomas, limitados por la membrana peribacteroidea.



Phaseolus, *Glycine* y *Lotus* [164a]. Por otro lado, los mutantes en los lipopolisacáridos tienen un fenotipo Fix⁻ en *Phaseolus* y *Glycine* [282a] y sin embargo, mutaciones en los lipopolisacáridos de *R. meliloti* pueden o no afectar al fenotipo simbiótico con alfalfa [106,205].

La respuesta inicial del pelo radical a la presencia de *Rhizobium* consiste en un incurvamiento para adoptar la forma de un cayado de pastor. El extremo incurvado engloba una o más bacterias que invadirán el pelo radical. La infección comienza con la formación de un **tubo de infección** que se inicia por la disolución enzimática de la pared del pelo radical [13,48] y la invaginación de la membrana citoplasmática de dicho pelo, a cuyo alrededor se depositan nuevos materiales idénticos a los de la pared celular [192,283] que aíslan al rizobio infectante. Se calcula que el tubo, que avanza por la célula precedido por el núcleo celular [218], alcanza la base del pelo radical al cabo de unas 48 horas [267]. Luego el tubo de infección se ramifica y avanza por las células del tejido cortical de la raíz hasta que alcanza un foco celular en "estado hipersensible" [156]. Recientes estudios permiten sugerir que estas células hipersensibles están localizadas en el córtex medio de la raíz y contienen concentraciones anormalmente altas de glicoproteínas ricas en prolina y de las enzimas fenilalanina amoníaco liasa y chalcona sintetasa, dos enzimas claves de la vía de biosíntesis de los fenilpropanoides, en la que se producen las fitoalexinas [156]. Por otra parte, también se ha observado que las células en las que termina el crecimiento del tubo de infección y las adyacentes contienen compuestos fenólicos en sus paredes celulares [282], lo que sugiere que los síntomas del estado hipersensible son la lignificación de la pared y la acumulación de fitoalexinas.

Las bacterias que han sido conducidas por el tubo de infección hasta las células corticales del vegetal proliferan en él y son liberadas al citoplasma de la célula por un proceso endocítico (Figura 1), como consecuencia del cual quedan rodeadas por una membrana de origen vegetal que establece un compartimento, denominado **simbiosoma**, en cuyo interior la célula se divide, pierde su forma bacilar y se hace mazuda y pleomórfica; entonces aparece el sistema nitrogenasa y otros complejos enzimáticos necesarios para la fijación del nitrógeno. En este estado, la bacteria recibe el nombre de **bacterioide**, conservando la primitiva denominación de los supuestos orgánulos fijadores de nitrógeno que se habían descrito en las células de los nódulos radicales de las leguminosas. En una leguminosa que fija activamente nitrógeno pueden encontrarse hasta 10.000 bacterioides por nódulo, que está compuesto de partes aproximadamente iguales de tejido vegetal y de bacterias [267]. Por otra parte, aunque el bacterioide requiere oxígeno para la producción de los altos niveles de ATP necesarios para el funcionamiento de la nitrogenasa, ésta, como queda dicho, es extremadamente sensible al oxígeno, cuyo nivel en el interior del nódulo se controla por una hemoproteína, similar a la hemoglobina de la sangre de los vertebrados que recibe, por ello, el nombre de **leghemoglobina**.

La formación del nódulo radical exige que las células corticales de la raíz se dividan, pero, a

diferencia de las implicadas en la formación de las raíces laterales, estas divisiones son anticlinales; por otra parte, no se inician en las células por las que avanza el tubo de infección, sino que tienen comienzo en células que están separadas por varias de ellas del extremo del tubo en progresión. La localización de las divisiones celulares iniciales presagia el tipo de nódulo que se va a formar y, a su vez, esto depende de la planta y no del rizobio [61,250]. Cuando las divisiones celulares se inician en una zona interna del córtex del vegetal, como ocurre en la mayor parte de las leguminosas de climas templados, como el guisante, la veza, el trébol o la alfalfa, se forman nódulos que reciben el nombre de **indeterminados** porque crecen indefinidamente y tienen forma alargada, mazuda [212,251]. Por el contrario, cuando las divisiones celulares se inician en la zona externa del córtex se originan nódulos **determinados**, de morfología esférica, que son característicos de leguminosas como la soja, la judía común o diversas especies de *Lotus* [251,303].

La diferencia citológica fundamental entre ambos tipos de nódulos radica en la existencia en los indeterminados de un meristemo persistente que se localiza en el extremo apical y hace que el nódulo crezca fundamentalmente por división y posterior diferenciación de las células. La forma alargada se debe a que se van añadiendo permanentemente nuevas células en el extremo del nódulo en el que se localiza el meristemo. Por otra parte, dado que en el nódulo indeterminado existe un gradiente en la edad de las células desde el extremo apical hasta la base proximal por la que se une a la raíz, en él se encuentran representados todos los estadios del desarrollo nodular (Figura 2). En el caso de los nódulos determinados no existe meristemo y, por consiguiente, el crecimiento del nódulo se debe más al aumento en tamaño de las células que a su división; por ello, se trata de nódulos de morfología esférica.

Ambos tipos de nódulos se diferencian también en los compuestos nitrogenados que se sintetizan en ellos y son transportados a otras partes de la planta: en los indeterminados se forman amidas; en los determinados, ureidos [156].

El modelo general que acabamos de describir tiene algunas excepciones. Así en algunos casos, las bacterias no son liberadas del tubo de infección al interior del citoplasma. Tal es el caso, por ejemplo, de mutantes auxotrofos para la leucina de *Rhizobium meliloti* simbioses con alfalfa [357], y el de rizobios silvestres que infectan a *Parasponia* [280] o a algunas leguminosas arbóreas [101,103]. En estos casos las células del nódulo se ven atravesadas por tubos ramificados que contienen los bacteroides, y a los que en ocasiones se ha denominado tubos de fijación [102].

El nódulo radical, cualquiera que sea su clase es el nicho microaerófilo en el que tiene lugar la fijación de nitrógeno. Ya se ha indicado que los rizobios son bacterias aerobias obligadas y que la fijación del nitrógeno es un proceso endergónico, sensible al oxígeno: estas dos características, aparentemente irreconciliables se armonizan en el interior del nódulo radical, cuyos tejidos centrales infectados tienen tensiones de oxígeno muy bajas que facilitan la actividad fijadora del bacteroide. En efecto, cerca de la

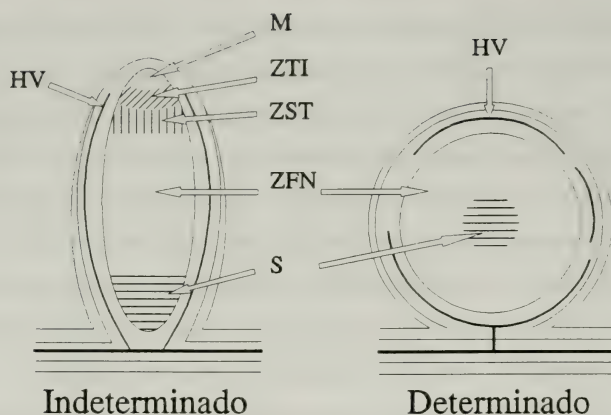


Figura 2. Organización citológica de los nódulos determinados e indeterminados descritos en las leguminosas. HV, haz vascular; M, meristemo; S, zona de senescencia; ZFN, zona fijadora de nitrógeno; ZST, zona simbiótica temprana; ZTI, zona temprana de infección.

periferia del nódulo existe una capa continua de células vegetales no infectadas que restringe y regula la difusión del oxígeno gaseoso hacia las zonas internas, que se mantienen, por ello, con unas tensiones de oxígeno disuelto, aproximadamente cien veces menores que las atmosféricas (0,2 por ciento), valor suficientemente bajo como para que la nitrogenasa pueda efectuar su acción catalítica. Además, como una adaptación adicional para la creación de un ambiente microaerófilo para los rizobios, las células infectadas que se localizan en los tejidos internos, contienen grandes cantidades de leghemoglobina, cuya función es facilitar la difusión del oxígeno a bajas concentraciones por el citoplasma de la célula vegetal infectada, aportando al rizobio un flujo de oxígeno suficiente para llevar a cabo la respiración y la fosforilación oxidativa [38].

4. Bioquímica y genética de la nitrogenasa

4.1. Componentes del sistema nitrogenasa

El mecanismo de fijación del nitrógeno parece muy similar en la mayor parte de los organismos diazotrofos. Un avance importante en el conocimiento del proceso fijador se produjo cuando se demostró que la reducción del nitrógeno hasta amoníaco podía ser efectuada *in vitro*, en presencia de piruvato, utilizando extractos libres de células de *Clostridium pasteurianum* [51]. Posteriormente se comprobó que

el proceso reductor dependiente de piruvato podía ser separado en dos componentes: uno de ellos era un sistema fosfóricoelástico en el que el piruvato es oxidado para producir ATP y poder reductor; el otro, al que se le dio el nombre de nitrogenasa, reducía el nitrógeno utilizando para ello el ATP y el poder reductor generados.

El sistema nitrogenasa ha sido aislado y en muchos casos purificado a partir de muchos diazotrofos, tanto de vida libre como simbióticos y en todos ellos tiene una estructura similar. En el aislamiento, se separa en dos componentes [243]. El primero de ellos se denomina **ferro-proteína**, nitrogenasa-reductasa, azoferredoxina, o componente II; contiene cuatro átomos de hierro y cuatro átomos de azufre lábiles, que constituyen un centro 4Fe-4S [125,258], al que se unen de forma simétrica dos subunidades polipeptídicas idénticas, de peso molecular variable entre 29.000 y 36.500 y de secuencias de aminoácidos muy conservadas, como se deduce de la alta homología del gen *nifH* que codifica para la ferro-proteína de *Klebsiella pneumoniae* y de *Rhizobium meliloti*. La función de esta ferro-proteína es la de actuar como reductor específico para el segundo componente de la nitrogenasa [333,334].

El otro componente, denominado **ferromolibdo-proteína**, dinitrogenasa, azofermo o componente I, es un tetrámero de estructura $\alpha_2\beta_2$. La subunidad α tiene un peso molecular aproximado de 56.000 [244] y está codificada por el gen *nifD*, mientras que la subunidad β es algo mayor (peso molecular, 60.000, [244] y está codificada por el gen *nifK*. Como en el caso de la ferro-proteína, las secuencias de aminoácidos de estas cadenas polipeptídicas están muy conservadas. El análisis elemental demuestra que contiene 2 átomos de molibdeno y entre 24 y 32 átomos de hierro [258,392]. Dado que el número de átomos de azufre lábiles es el mismo que el de átomos de hierro, se puede admitir que ambos se encuentran formando centros Fe-S. De hecho, parecen existir seis de estos centros metálicos, dos de ellos del tipo 4Fe-4S , que se denominan **centros P** y dos del tipo 6Fe-8Mo-6S , denominados centros M o **cofactores de hierro y molibdeno**, FeMo-co [88,331].

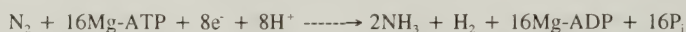
Existen otras nitrogenasas, denominadas **alternativas**, por lo que la dependiente de molibdeno, cuya estructura acabamos de comentar, recibe el nombre de **nitrogenasa 1**. En efecto, desde antiguo venía siendo conocido que algunos diazotrofos pueden fijar el nitrógeno en ausencia de molibdeno, por lo que se postulaba la existencia en ellos de una dinitrogenasa diferente que no requiriera este metal. El problema fue resuelto cuando se determinó la existencia de una **nitrogenasa 2**, cuyo componente I utiliza vanadio en lugar de molibdeno y es denominada VaFe proteína [23,90,323]. Posteriormente, se ha aislado un tercer tipo de nitrogenasa, denominada **nitrogenasa 3**, que posee una Fe-Fe proteína [59]. Todas las nitrogenasas tienen en común estar formadas por dos componentes metaloproteicos, el componente I, o dinitrogenasa, que contiene el sitio activo de la enzima, y que puede llevar un cofactor FeMo-co, o FeVa-co, o FeFe-co, y el componente II, o nitrogenasa reductasa, que reduce específicamente al componente I. Este segundo

componente es siempre una ferro-proteína con un centro metálico del tipo 4Fe-4S.

4.2 Función catalítica de las nitrogenasas

Al parecer, el funcionamiento de los tres tipos de nitrogenasa tiene los mismos requerimientos: son necesarios, además de los dos componentes del sistema y de magnesio, un reductor de bajo potencial, ATP y condiciones microaerófilas [59]. Dado que el primer sistema nitrogenasa descrito fue el dependiente de molibdeno, es el más estudiado y del que se posee un mayor cuerpo de conocimientos. Además de su sustrato natural, el dinitrógeno, la Mo-nitrogenasa puede reducir a otros sustratos diferentes (azida, cianuro acetileno y protones, entre otros), que se comportan como inhibidores de la fijación del nitrógeno [41]. Un sustrato alternativo de la nitrogenasa que tiene gran interés es el acetileno. En efecto, la reducción de acetileno a etileno por la nitrogenasa es muy eficaz: la K_m de la enzima para este sustrato es 0,1 mM, similar a la que tiene para el N_2 , y el producto, el etileno puede ser fácilmente detectado por cromatografía de gases. Por ello, la actividad *in vivo* de la nitrogenasa se ensaya utilizando acetileno como sustrato en lugar de nitrógeno molecular. Dado que la reducción del acetileno requiere sólo dos electrones, en lugar de los seis necesarios para la reducción del dinitrógeno hasta amoníaco, cabe esperar que la relación N_2 fijado/etileno producido sea de 1:3. Sin embargo, los valores reales obtenidos difieren de este valor teórico, en función del sistema experimental empleado, del material biológico utilizado y en el caso de los nódulos radicales, de la presencia en ellos de etileno que, como es sabido, es una hormona vegetal. Esto limita en gran medida la utilización del test de reducción del acetileno para estudios cuantitativos, aunque sigue siendo de gran utilidad, por su sencillez y sensibilidad, para estudios cualitativos. Otra aplicación de este procedimiento deriva del hecho de que la nitrogenasa dependiente de vanadio también puede reducir el acetileno, pero produciendo, además de etileno, etano [72]. Dado que la nitrogenasa dependiente de molibdeno no forma etano como producto de reducción del acetileno, el ensayo de dichos productos permite detectar el funcionamiento *in vivo* de nitrogenasas alternativas.

La velocidad del flujo de los electrones hacia la nitrogenasa es independiente del sustrato e, incluso en condiciones óptimas para la reducción del dinitrógeno, aproximadamente el 25 por ciento de los electrones suministrados al sistema son utilizados para la reducción de protones:



Esta producción de hidrógeno se cree debida a que la unión del N_2 a la nitrogenasa requiere la existencia de un sitio reducido en la enzima y que la unión del dinitrógeno al mismo desplaza H_2 [58]. En efecto, como se puede deducir del mecanismo de funcionamiento de la enzima, expuesto en el esquema de la figura 3, el reductor inmediato del sistema, que en *Rhizobium* es la ferredoxina (Fd) reducida [52] y en

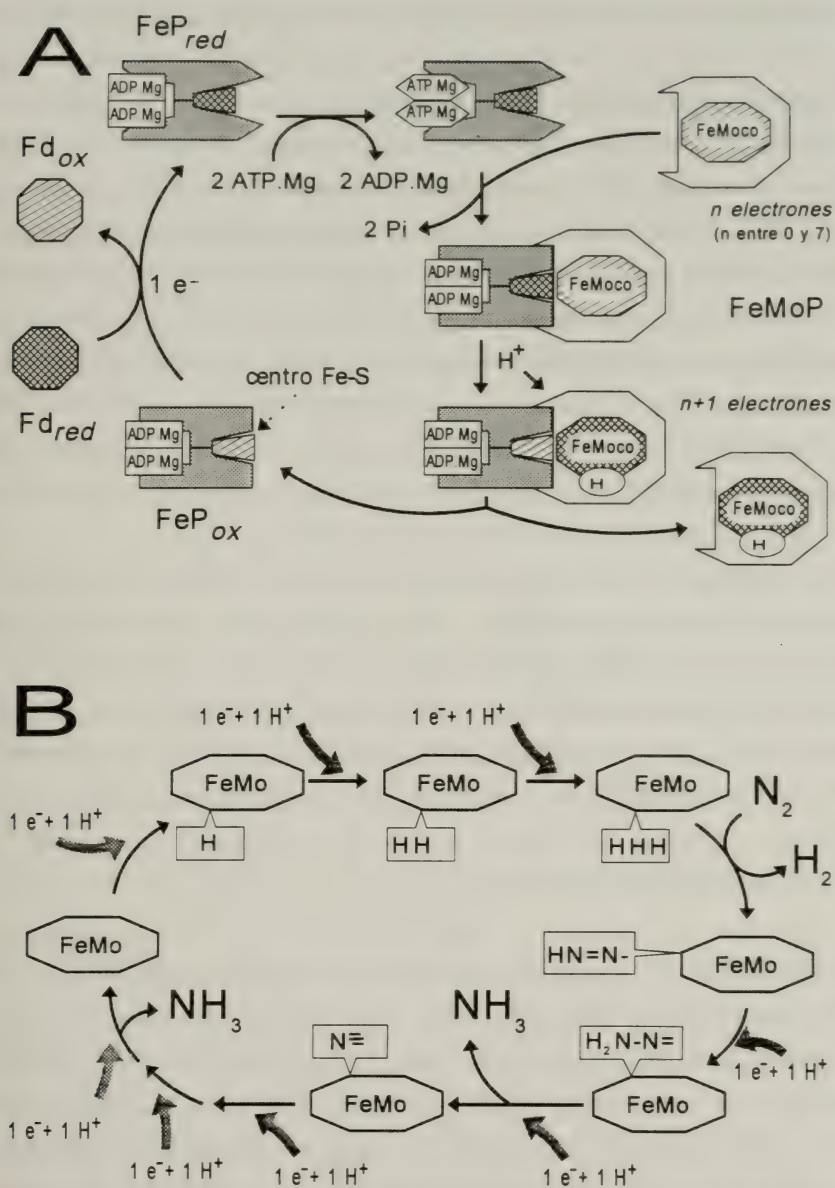


Figura 3. Mecanismo de acción de la nitrogenasa. A. Reducción de la nitrogenasa (FeMoP) por la nitrogenasa - reductasa (FeP). B. Ciclo de reducción del nitrógeno por la nitrogenasa. Cada incorporación de un electrón implica un ciclo completo como el representado en A.

Klebsiella pneumoniae, la flavodoxina reducida [326], transfiere los electrones a la ferroproteína, que en presencia de MgATP altera su conformación y se convierte en un componente de bajo potencial. En este estado la ferro-proteína se combina con la nitrogenasa, hidrolizándose el ATP, y le transfiere un electrón. Simultáneamente, el FeMo-co toma un protón del medio. Cada vez que tiene lugar la transferencia de un electrón, la ferroproteína se combina y se disocia del otro componente y tiene lugar la hidrólisis de dos moléculas de MgATP [42]. Como consecuencia de esta transferencia de electrones, se forma un trihidruro de la enzima [216,352] al que se une la molécula de dinitrógeno desplazando dos átomos de hidrógeno [58]. A partir de este momento, son necesarios cinco electrones adicionales para formar las dos moléculas de amoníaco. De estas consideraciones sobre el mecanismo de acción de la nitrogenasa cabe deducir que la producción de hidrógeno es un aspecto esencial e inevitable del propio funcionamiento de la enzima. Aunque la nitrogenasa dependiente de vanadio tiene la misma afinidad por el N_2 que la dependiente de molibdeno, cataliza la reducción de protones a H_2 en mayor medida y se estima que en este caso al menos el 50 por ciento de los electrones son empleados para esta función [90].

El aparentemente inútil consumo de ATP para la producción de hidrógeno es compensado en muchos diazotrofos aerobios, tanto simbióticos como de vida libre, por la acción de una hidrogenasa (sistema Hup, de *Hydrogen uptake protein*) muy activa que permite reciclar el hidrógeno producido. Su actividad tiene como resultado la generación de ATP y una mejora de la eficacia metabólica del organismo [100], hasta el punto de que en *Bradyrhizobium japonicum* permite, bajo ciertas condiciones un crecimiento quimiolitotrofo utilizando H_2 y CO_2 como únicas fuentes de energía y carbono, respectivamente [145,210].

4.3 Genética de la fijación del nitrógeno

El estudio de la genética de la fijación de nitrógeno se inició en *Klebsiella pneumoniae*, en la que se han identificado al menos 21 genes *nif* que controlan el proceso. Estos genes están organizados en ocho regiones de transcripción comprendidas en una porción del cromosoma de 23 kb [50]. Los polipéptidos estructurales de la nitrogenasa están codificados por el operón *nifHDK* [294,296], mientras que otros operones regulan funciones diversas: la biosíntesis de FeMo-co está controlada por los operones *nifBQ*, *nifEN* y *nifX* [172,296,325], la modificación post-traducciona l de los componentes de la nitrogenasa es llevada a cabo por proteínas codificadas en el operón *nifUSVM* [294-296] y las proteínas transportadoras de electrones están codificadas en los operones *nifF* y *nifJ* [154,296,337]. Por último, el operón *nifAL* regula la transcripción del conjunto de genes *nif* [91]. Cuando los genes *nif* de *K. pneumoniae* son transferidos a otras bacterias como *Escherichia coli* [77], *Salmonella typhimurium* [278], *Agrobacterium tumefaciens* [74,75] o mutantes Nif⁻ de *Azotobacter vinelandii* [49] o de *Rhizobium* [75], la bacteria

receptora se hace diazotrofa y la expresión de los genes *nif* está sometida a represión por el nitrógeno fijado o por el oxígeno.

Cuando se logró la clonación de los genes *nif* de *K. pneumoniae* en plásmidos, se abrió la posibilidad de investigar la presencia de genes similares en otros diazotrofos, mediante técnicas de hibridación de ADN que han puesto de manifiesto la existencia de genes *nif* altamente conservados en todos los diazotrofos investigados hasta ahora, sobre todo en los que se refiere al operón *nifHDK*, lo que indica un notable grado de conservación en la estructura de la nitrogenasa, pese a que los diazotrofos son un conjunto filogenético diverso de bacterias [224,308]. En algunos, los genes *nif* son de localización cromosómica, pero en otros, como *Rhizobium*, *Lignobacter* o *Enterobacter agglomerans*, se encuentran en plásmidos [252]. Algunos autores encuentran la explicación del alto grado de conservación de los genes de la nitrogenasa precisamente en esta localización plasmídica de los genes *nif*. Para ellos, en muchos diazotrofos la capacidad fijadora sería de adquisición reciente mediante una transferencia horizontal de genes. Sin embargo, si ello hubiera sido así, también cabría esperar un alto grado de homología en genes *nif* diferentes de los estructurales de la nitrogenasa y, como queda dicho, el mayor grado de homología se encuentra en el operón *nifHDK*. En nuestra opinión, cabe una explicación alternativa: la fijación del dinitrógeno debe ser una actividad de aparición temprana en el curso de la evolución, como lo sugiere la existencia de arqueobacterias diazotrofas y la extremada sensibilidad al oxígeno de la nitrogenasa. Quizás la actividad de la enzima sea muy dependiente de las estructuras secundaria y terciaria de sus componentes y, por ello, sean permisibles muy pocos cambios en la secuencia de aminoácidos [39].

Dado que la nitrogenasa es uno de los principales constituyentes celulares de los diazotrofos (puede llegar a suponer el quince por ciento de la proteína celular soluble) y que su actividad catalítica es extremadamente costosa en términos de ATP consumido, no resulta extraño que en todos los sistemas fijadores de nitrógeno la función de los genes *nif* esté sometida a una estricta regulación para evitar que, por un exceso en el medio de nitrógeno combinado o de oxígeno, el proceso se haga superfluo por la falta de eficacia o por inactivación de la nitrogenasa [257]. Así, en presencia de oxígeno o de una fuente de nitrógeno combinado abundante se reprime la síntesis de la enzima [89,361]. En *K. pneumoniae* los diferentes operones *nif* constituyen un regulón, sujeto a control positivo (activación) y negativo (represión). Ambos tipos de control se ejercen a dos niveles jerárquicos diferentes. El primero de ellos está ejercido por el sistema Ntr (regulación general del metabolismo del nitrógeno) que afecta no sólo a los genes *nif*, sino también a otros operones del metabolismo del nitrógeno, como los de la utilización de la arginina, la histidina o la prolina [219] y el otro, a cargo del operón *nifL4*, es específico para los operones *nif*.

El sistema Ntr está formado por tres genes: *ntrA* que codifica un factor sigma (σ^N), diferente del factor σ^{70} convencional, que es necesario para la transcripción específica de los operones sometidos a

[illegible]

En este caso la represión depende exclusivamente del producto NifL que, en presencia de altas tensiones de oxígeno se modifica e inactiva al producto NifA [155,238].

En el caso de los rizobios, la organización de los genes *nif* y su regulación son diferentes. Por ejemplo, los genes estructurales de la nitrogenasa, *nifHDK*, forman un solo operón, localizado en el plásmido pSym, en *R. meliloti* y *R. leguminosarum*, pero en *B. japonicum* están separados en dos operones diferentes, *nifH* y *nifDK*, de localización cromosómica [214]. Por otra parte, en estos diazotrofos simbióticos se han encontrado otros genes para la fijación del dinitrógeno, que no son homólogos con los de *K. pneumoniae* y que reciben el nombre de genes *fix*. Aunque en la mayor parte de los casos no se ha identificado aun la función bioquímica exacta de los genes *fix*, las secuencias de nucleótidos de algunos de ellos guardan homología con las de los genes de las ferredoxinas bacterianas y otras metaloproteínas [136,92,93,152,195,247]. La regulación de los genes de la fijación también es diferente en los rizobios: el gen *nifA* es activado a través de una cascada que se desencadena cuando los niveles de oxígeno del medio caen por debajo de cierto umbral. En estas condiciones, la proteína FixL, localizada en la membrana actúa como sensor de oxígeno, se autofosforila y transfiere el grupo fosfato a una proteína reguladora, FixJ [62,274]. La proteína FixJ fosforilada induce la transcripción de *nifA* y de *fixK*. El producto NifA, junto con el factor sigma NtrA, enciende los restantes genes *nif* y *fix*. Por otra parte, la propia proteína NifA es sensible al oxígeno [22] y representa por ello un segundo nivel de regulación de los genes *nif* y *fix*.

5. Fisiología del nódulo radical

5.1 Intercambio gaseoso

Para que en el nódulo radical, una vez formado, se lleve a cabo una fijación de nitrógeno eficaz es necesario que se cumplan una serie de condiciones, que han sido revisadas [382,383] y que se pueden resumir en las tres siguientes:

a) debe existir una barrera de difusión para el oxígeno que equilibre su entrada con el consumo en el interior del nódulo.

b) una tasa respiratoria relativamente alta en la célula infectada a fin de que se produzca una caída relativamente rápida en la concentración de oxígeno disuelto.

c) una red de espacios aéreos interconectados entre las células infectadas. Como el oxígeno difunde una diez mil veces mejor en el aire que en medio acuoso, la presencia de estos espacios permite un rápido movimiento del gas por la zona infectada, de tal forma que sólo penetra en la célula una pequeña fracción. De no existir estos espacios, el centro del nódulo sería absolutamente anaerobio. La leghemoglobina

existente en el citosol de la célula infectada completa el flujo del oxígeno hasta la superficie del bacteroide.

Estos mecanismos protectores no deben impedir ni la entrada de nitrógeno ni la salida de CO_2 , procedente de la actividad respiratoria, o de H_2 , procedente de la actividad nitrogenasa. El aporte de nitrógeno se asegura merced a su elevada concentración en el aire atmosférico y a la gran capacidad del bacteroide para reducirlo hasta NH_3 , lo que permite la formación de un gradiente de concentración suficiente para que pueda difundir hasta el interior del tejido nodular [16]. Por el contrario, la difusión hacia el exterior del CO_2 y del H_2 es más compleja, ya que en ambos casos se deben establecer gradientes lo suficientemente amplios como para permitir que estos gases difundan hacia fuera con la misma velocidad en que son generados como consecuencia de la actividad metabólica de la célula infectada. El CO_2 se encuentra en equilibrio con su forma hidratada, el ion HCO_3^- , que difunde en medio acuoso mucho más rápidamente que el CO_2 , aunque a través de las membranas lo haga más lentamente, debido a la existencia de una carga negativa. En medio acuoso, la reacción de hidratación del CO_2 es lenta, pero en los nódulos existe la enzima anhidrasa carbónica, que cataliza la formación de HCO_3^- y hace que la velocidad de difusión del CO_2 no se vea limitada por la de su hidratación, sino por la magnitud del gradiente de HCO_3^- formado. Por otra parte, al evitarse la acumulación de CO_2 , se favorece el funcionamiento de la leghemoglobina, ya que la afinidad de esta proteína por el oxígeno disminuye en presencia de CO_2 [16]. En lo referente al H_2 , su velocidad de difusión es mucho mayor que la del oxígeno y, por ello, aunque no se establezcan grandes gradientes, es posible que difunda hacia fuera sin que llegue a acumularse en el nódulo a concentraciones que inhiban a la nitrogenasa. Además, debe recordarse la existencia en los bacteroides de muchos rizobios del sistema Hup que reciclaría el hidrógeno haciendo innecesaria su salida al exterior nodular.

5.2 Metabolismo del carbono

Debido a la mayor facilidad para su aislamiento, los simbiosomas del sistema *Bradyrhizobium japonicum*-soja han sido los más estudiados desde este punto de vista y, por ello, la discusión que sigue estará centrada fundamentalmente en él, aunque, cuando se disponga de datos sobre otras simbiosis, se hará mención de ellos. Ya se ha indicado que el funcionamiento de la nitrogenasa requiere electrones y energía. Se admite que la fuente principal de ambos requerimientos es el fotosintato de la planta, ya que la falta de fotosintato, impuesta experimentalmente cultivando a la planta en oscuridad, tiene como consecuencia una disminución en la tasa de fijación de nitrógeno [372]. El fotosintato es metabolizado en las células del nódulo para producir el poder reductor necesario para reducir a la ferredoxina, reductor inmediato de la nitrogenasa reductasa, y el ATP necesario para la acción de esta última. También se ha indicado que la

célula infectada está compartimentada y que el bacteroide se encuentra (solo o formando grupos en número variable) en el interior del simbiosoma, orgánulo delimitado por una membrana que recibe el nombre de **membrana peribacteroidea**. Por consiguiente, la discusión del metabolismo del carbono debe hacerse teniendo en cuenta esta compartimentación de la célula.

5.2.1. Metabolismo en el citosol

El principal producto de la fotosíntesis translocado al nódulo es la sacarosa [288] pero no es probable que actúe como fuente primaria de energía para los bacteroides, ya que la velocidad de entrada a través de su membrana es muy baja [127] y no se ha detectado en ellos invertasa, enzima que cataliza la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa [222,341]. Por otra parte, aunque en el citosol de la planta infectada existe invertasa [341], la entrada de glucosa en el bacteroide se inhibe por la presencia de ácidos dicarboxílicos como el succinato o el malato que también se detectan en el citosol [314,342]. Por consiguiente, los hidratos de carbono han de ser metabolizados en el citosol para rendir compuestos que puedan atravesar la membrana peribacteroidea y la del bacteroide.

Gran parte de la sacarosa que llega al nódulo es almacenada en el citosol de las células infectadas en forma de almidón [164,375], lo que refleja un exceso de aporte de sacarosa para suplir los requerimientos de la fijación del nitrógeno, ya que la acumulación de almidón es considerada generalmente como consecuencia de un exceso de carbohidratos. En cualquier caso, parte de la sacarosa importada al nódulo es hidrolizada por la invertasa del citosol en glucosa y fructosa, que son metabolizadas por la glucólisis o mediante la vía de las pentosas fosfato [16]. Es casi un paradigma, derivado de los estudios con células animales, que la glucólisis rinde piruvato que luego es importado a la mitocondria donde es convertido en acetil-CoA y metabolizado a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Sin embargo, en las células infectadas el número de mitocondrias es muy pequeño en relación con el de bacteroides, por lo que no parece probable que la actividad mitocondrial sea suficiente como para suministrar todo el ATP necesario para la actividad de la nitrogenasa. Por otra parte, debe ser tenido en cuenta que en las condiciones microaerófilas del nódulo es posible que el ciclo TCA mitocondrial no actúe ya que algunas de sus enzimas, como la citrato sintasa, la NADP-isocitrato dehidrogenasa y la α -cetoglutarato dehidrogenasa, se inhiben o se reprimen en estas condiciones [226]. Por consiguiente, debe ser considerada otra vía alternativa en la que la glucólisis rinde malato y que en las células vegetales en general puede tener una importancia cuantitativa, al menos, similar a la considerada "clásica", es decir, glucólisis, ciclo TCA, cadena respiratoria [63,202]. En estas células existen dos enzimas, la fosfoenolpiruvato carboxilasa y la malato dehidrogenasa que catalizan la conversión del oxalacetato en malato [202]. La

enzima málica, también presente en el citosol produciría piruvato a partir del malato, lo que, a su vez, constituye una fuente adicional de piruvato y CO_2 , sustratos de la fosfoenolpiruvato carboxilasa. Por otra parte, es también posible que el malato no sea el único compuesto ácido producido en el citosol, ya que en condiciones de baja tensión de oxígeno se producen también ácidos dicarboxílicos C_4 , como el succinato o el fumarato [63,139,203]. El análisis de los ácidos orgánicos presentes en los nódulos, tanto determinados como indeterminados, parece indicar la existencia en las células infectadas de una vía reductora para la síntesis de dicarboxilatos C_4 [371]. En cualquier caso, los dicarboxilatos más abundantes en el nódulo son el malato y el succinato. Por otra parte, los análisis de actividades enzimáticas en el citosol, demuestran cantidades muy elevadas de proteínas y de actividades fosfoenolpiruvato carboxilasa, malato dehidrogenasa y aspartato aminotransferasa [54,85,96,120,200,344,376] que son las enzimas claves para dirigir el flujo del carbono hacia la producción de malato [139,231,369]. Por otra parte, en nódulos ineficaces o de plantas sometidas a determinados tratamientos, como la adición de nitratos, la eliminación de los retoños o en presencia de inhibidores, se produce una caída paralela en la concentración de ácidos orgánicos, en las actividades de estas tres enzimas y en la actividad nitrogenasa [96,320,370]. Lo que permite sugerir que es el malato el compuesto carbonado que, principalmente soporta la actividad de la nitrogenasa.

5.2.2. Transporte a través de la membrana peribacteroidea

Como ya se ha indicado, los bacteroides se encuentran encerrados en orgánulos específicos, los simbiosomas, que están delimitados por una membrana que recibe el nombre de **membrana peribacteroidea**. Cada vez son más abundantes los datos que sugieren que la formación de la membrana peribacteroidea no es una mera consecuencia de la internalización de la membrana citoplasmática de la célula infectada. Así, se ha comprobado que se trata de una membrana con una alta proporción lípidos:proteínas [300] y que contiene fosfatidilcolina, que es sintetizada en el retículo endoplásmico y transportada por el sistema de Golgi de la célula infectada [234]. De igual forma, contiene glicoproteínas específicas que son procesadas en el retículo endoplásmico y en el sistema de Golgi o en ambos compartimentos [377,378]. Por otra parte, las comparaciones de los perfiles proteicos obtenidos por electroforesis en geles de poliacrilamida y por inmunoelectroforesis demuestran la falta de identidad entre la membrana peribacteroidea y la citoplasmática [236]. Por último, la membrana peribacteroidea posee una ATPasa [25,81] que puede generar un potencial de membrana en el simbiosoma intacto [363].

Entre las proteínas que forman parte de la membrana peribacteroidea se encuentran las que regulan el paso de metabolitos entre el citosol de la célula infectada y el bacteroide. Además de la ATPasa que hemos mencionado, contiene una proteína-quinasa dependiente de iones calcio, que interviene en la

regulación del transporte de metabolitos, ya que se admite que la fosforilación de proteínas estimula la tasa de transporte de malato a través de la membrana peribacterioidea, representando un importante mecanismo regulador durante la fijación del nitrógeno [260]. Por consiguiente, la membrana peribacterioidea no es sólo un sistema de aislamiento del bacterioide y del citosol celular, sino que se trata de un centro metabólico muy activo que controla el funcionamiento de la simbiosis.

De los compuestos carbonados que se encuentran en el citosol de la célula infectada, los más abundantes son los carbohidratos, los ácidos dicarboxílicos y el glutamato [73,181]. De ellos, la sacarosa, la glucosa y la fructosa no pueden atravesar la membrana peribacterioidea [65,316]. En realidad, se detecta un cierto paso de glucosa y de fructosa a través de dicha membrana, pero su velocidad es muy lenta [362] y no muestra saturación por sustrato [365], lo que sugiere que se trata de un proceso de difusión pasiva y no de un transporte mediado por transportador [65]. Un disacárido que se encuentra en grandes cantidades en el simbiosoma y también en el citosol de la célula infectada es la trehalosa. Como se acaba de comentar, la membrana peribacterioidea carece de transportadores para la glucosa, pero sí puede transportar UDP-glucosa [313], que puede provenir de la sacarosa presente en el citosol mediante la reacción reversible de la sacarosa sintetasa, enzima muy abundante en las células del nódulo [242]. Dado que el bacterioide contiene enzimas fosforilantes de la glucosa y de la fructosa, se puede sintetizar en él la trehalosa, que luego se puede hidrolizar por una trehalasa presente tanto en el citosol de la célula infectada como en el espacio peribacterioideo [232]. Además, los bacterioides de *B. japonicum* contienen dos enzimas capaces de hidrolizar la trehalosa: la fosfotrehalasa, que produce glucosa-6-fosfato y glucosa, y la trehalosa fosforilasa, que rinde glucosa-1-fosfato y glucosa [311]. El resultado final de este sistema sería el transporte de glucosa a través de una membrana inicialmente impermeable a ella [55]. Todavía no se dispone de información suficiente acerca de algún otro papel que la trehalosa pudiera desempeñar en el funcionamiento de la simbiosis.

De cualquier forma, los carbohidratos deben ser poco relevantes para el mantenimiento de la actividad fijadora de nitrógeno y no constituyen una fuente de energía directa para el bacterioide, como lo sugiere el hecho de que las enzimas claves de la vía de Embden-Meyerhof (la fosfofructoquinasa), de la vía oxidativa de las pentosas fosfato (la 6-fosfogluconato dehidrogenasa) o de Entner-Doudoroff (la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa) no se detecten en el bacterioide, o bien sus actividades sean mínimas y desde luego mucho menores que las que presenta la bacteria en vida libre [173,316,317]. Por otra parte, mutantes de *Rhizobium* deficientes en algunas de las enzimas del metabolismo de la hexosas, como la glucoquinasa, la fosfogluco-isomerasa, la fructoquinasa o la piruvato dehidrogenasa, forman nódulos eficaces (capaces de fijar el nitrógeno) en la leguminosa hospedadora específica [16].

La hipótesis de que el glutamato sería un sustrato carbonado ideal durante la fijación del nitrógeno

[181] hizo centrar la atención en el transporte de este aminoácido a través de la membrana peribacterioidea. Sin embargo, se demostró que, si bien los bacteroides aislados captan el aminoácido por un mecanismo mediado por transportador que, además es dependiente de la fuerza protónmotriz del bacteroide, la membrana peribacterioidea es impermeable a él [367], por lo que tampoco debe ser relevante en el funcionamiento de la actividad fijadora de nitrógeno en el nódulo.

Por el contrario, el transporte de ácidos orgánicos, especialmente malato y succinato, es muy rápido, tanto por los bacteroides como a través de la membrana peribacterioidea, se inhibe por agentes desacoplantes y por inhibidores de la respiración, y muestra cinética de saturación [367]. Además, los sistemas de transporte a través de la membrana peribacterioidea y de entrada en el bacteroide deben ser diferentes, ya que el primero es sensible a los ácidos ftalónico y cianocinámico, mientras que el segundo, no [366]. El de la membrana peribacterioidea tiene menor afinidad por el malato y el succinato que el del bacteroide, pero las $V_{\max}$ de ambos sistemas son similares. El primero es único y cataliza el transporte de una gama relativamente amplia de dicarboxilatos y tiene mayor afinidad por el succinato y el malato. Además, el transporte de estos ácidos se inhibe por la carbonilcianuro *m*-clorofenil hidrazona (CCCP), un agente desacoplante y por el KCN, un inhibidor del transporte de electrones respiratorio y se estimula por el ATP [259], lo que demuestra que es dependiente de un estado energético de la membrana peribacterioidea. Probablemente, este transportador de dicarboxilatos existente en la membrana peribacterioidea sea una única molécula de proteína, la denominada **nodulina 26** [260].

Parece probado, pues, que los únicos sustratos carbonados que atraviesan la membrana peribacterioidea a una tasa suficiente como para soportar la actividad de la nitrogenasa son los dicarboxilatos, especialmente el succinato y el malato.

5.2.3. Metabolismo en el bacteroide

El hecho de que el malato sea el dicarboxilato más abundante en el citosol de la célula infectada y de que pueda atravesar rápida y eficazmente la membrana peribacterioidea, así como la inexistencia en los bacteroides de las enzimas claves del metabolismo de las hexosas, convirtieron a este compuesto en el metabolito clave en el interior del bacteroide. Para su metabolismo es necesaria la presencia de un ciclo TCA eficaz, como lo prueban el hecho de que los rizobios mutantes en el transporte de dicarboxilatos forman nódulos ineficaces [6,34,107,126,253,304] al igual que las estirpes mutantes defectivas en alguna enzima del ciclo TCA [87,122]. Por otra parte, en todos los casos estudiados hasta ahora las actividades específicas de las enzimas del ciclo TCA son mucho más elevadas que las de las restantes enzimas del metabolismo del carbono, tanto en el estado de bacteroide [173] como de célula vegetativa [173,208].

La entrada de los dicarboxilatos en el bacteroide se efectúa a través de un transportador (el sistema *drc*) que se ha descrito tanto en *Rhizobium* [34,107,304] como en *Bradyrhizobium* [168]. Kahn y col. [181] sugirieron que la entrada de malato se vería favorecida, además, por la denominada **lanzadera malato-aspartato**. De acuerdo con estos autores, el malato importado por los bacteroides sería oxidado hasta oxalacetato por la malato dehidrogenasa y luego transaminado hasta aspartato por una aspartato aminotransferasa dependiente de glutamato, rindiendo aspartato y α -cetoglutarato que serían exportados al citosol de la célula infectada. Esta afirmación estaba basada en el hecho de que en los bacteroides de *B. japonicum* existen cantidades importantes de la aspartato aminotransferasa [200,309]. La salida de α -cetoglutarato del bacteroide hacia el citosol celular mantendría el potencial electroquímico a través de la membrana del bacteroide a fin de compensar en parte la captación de malato. En apoyo adicional de esta interpretación está el hecho de que cuando los bacteroides de soja aislados son incubados en presencia de glutamato marcado con ^{14}C y malato frío, en la mezcla de reacción se acumula α -cetoglutarato marcado con ^{14}C . [343]. Ahora bien, para que continúe el flujo de compuestos carbonados entre el citosol celular y el bacteroide sería necesario que en el citosol el α -cetoglutarato fuera transaminado con aspartato por acción de la aspartato aminotransferasa del vegetal, para producir glutamato y oxalacetato. Este último sería reducido luego a malato por la málico dehidrogenasa y podría entrar de nuevo en el simbiosoma. Pero el funcionamiento de la lanzadera exige la entrada de glutamato que donaría los grupos amino para la transaminación inicial del oxalacetato por la aspartato aminotransferasa del bacteroide. Esta entrada de glutamato es posible a través de la membrana del bacteroide [21,312,367], pero ya hemos visto cómo la membrana peribacteroidea es una barrera de permeabilidad para el glutamato [367], por lo que esta lanzadera no parece estar implicada en el intercambio de metabolitos entre el citosol y el bacteroide.

Una vez en el interior del bacteroide, el malato es metabolizado mediante un complejo sistema que implica al ciclo TCA, al ciclo de los ácidos dicarboxílicos (DCA), la síntesis de poli- β -hidroxibutirato y, en cierta medida, la fermentación del piruvato. A continuación veremos cada una de estas vías metabólicas:

5.2.3.1. El ciclo TCA

Dado el significado metabólico del ciclo TCA en los bacteroides, se hace necesario comentar su función y los mecanismos de regulación del mismo que operan en la simbiosis. Como en otros organismos heterotrofos las funciones básicas del ciclo TCA son suministrar precursores biosintéticos y, acoplado con la cadena respiratoria, generar la mayor parte del ATP necesarios para el crecimiento o para las reacciones endergónicas que tienen lugar en el bacteroide. También como en los restantes organismos, el ciclo es cebado con acetil-CoA que se combina con el oxalacetato para formar citrato, compuesto de seis átomos

de carbono que experimenta cuatro reacciones de oxidación, dos de las cuales (las catalizadas por la isocitrato dehidrogenasa y por la α -cetoglutarato dehidrogenasa) son también reacciones de descarboxilación, de tal forma que se eliminan los dos átomos de carbono correspondientes al acetil-CoA y se regenera el aceptor de cuatro carbonos, el oxalacetato. Los dos compuestos iniciadores del ciclo, el oxalacetato y el acetil-CoA, provienen del malato importado desde el citosol celular. El oxalacetato puede ser formado por la reacción catalizada por la málico dehidrogenasa y el acetil-CoA se formaría a partir del oxalacetato por una serie de reacciones anapleróticas, cuya naturaleza exacta aun no es clara, ya que, en realidad, son posibles varias rutas. En los bacteroides de *B. japonicum* no parece existir la fosfoenolpiruvato carboxilasa [344], que es la enzima que cataliza la carboxilación del fosfoenolpiruvato, un intermediario de la glucólisis, hasta oxalacetato, pero son posibles otras vías alternativas. Una de ellas implicaría la reducción del malato hasta oxalacetato por la málico dehidrogenasa, seguida por la reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa que descarboxila el oxalacetato hasta fosfoenolpirúvico y que ha sido detectada en los bacteroides, pero parece no ser esencial para el funcionamiento del nódulo [227]. La conversión del fosfoenolpiruvato hasta piruvato estaría catalizada por la piruvatoquinasa, enzima que también ha sido detectada en los bacteroides [200]. Otra alternativa implica a la enzima málica (malato dehidrogenasa descarboxilante) que rinde piruvato y CO_2 . Esta enzima ha sido detectada en los bacteroides de *B. japonicum* [199] y parece desempeñar un significativo papel en la oxidación de los ácidos dicarboxílicos [228]. Vemos, pues, que cualquiera de las vías posibles utiliza como intermediario al piruvato que luego sería descarboxilado hasta acetil-CoA, que tendría diversos destinos: cebar al ciclo TCA, entrar en el ciclo DCA, ser usado en la producción de PHB o reducirse hasta etanol vía acetaldehído [226].

Con respecto a la regulación del ciclo TCA en los bacteroides de los rizobios se dispone de poca información, ya que han sido pocas las enzimas aisladas y caracterizadas. Waters y col. [376] aislaron la málico dehidrogenasa de *B. japonicum* que es sensible a varios metabolitos efectores, entre los que se encuentra el NADPH [98]. La isocítrico dehidrogenasa de *R. meliloti* es sensible al ATP y en menor medida al ADP y al AMP [57]. En rizobios infectivos en *Lotus* se encuentra una isocítrico dehidrogenasa dependiente de NAD que en la bacteria en forma libre es sensible al ATP, mientras que en el bacteroide no responde a los nucleótidos de adenina [246], lo que sugiere que esta actividad radica en enzimas diferentes en la bacteria en forma libre y en el bacteroide. Recientemente [221] se ha descrito que en *Bradyrhizobium (Lupinus)* la actividad málico dehidrogenasa radica en una enzima en la forma libre de la bacteria y en dos, en el bacteroide. En *B. japonicum* la piruvato dehidrogenasa se inhibe por el NADH [97].

Un hecho que debe ser tenido en cuenta es que el ciclo TCA se encuentra, en la mayoría de los organismos, regulado por el oxígeno. Así, la isocitrato dehidrogenasa y la α -cetoglutarato dehidrogenasa,

las dos enzimas descarboxilantes del ciclo, así como la citrato sintasa, suelen ser sensibles al NAD(P)H y su expresión y actividad se inhiben en condiciones anaerobias en las que se produce una elevación de la proporción NADH/NAD [174,323]. Dado que en el nódulo existe un ambiente microaerófilo se ha cuestionado si la rama descarboxilante del ciclo TCA desempeña realmente un papel importante en el metabolismo del bacteroide y en la fijación del nitrógeno [226]. Recientemente se han aislados mutantes de *R. meliloti* carentes del gen estructural de la isocítrico dehidrogenasa (*idc*). Estos mutantes forman el mismo número de nódulos que la estirpe silvestre y con forma y tamaño normales, pero ineficaces y, además, carentes de leghemoglobina. A partir de estos mutantes fueron aislados pseudorevertientes, carentes de actividad citrato sintasa, que sólo formaban nódulos rudimentarios [180]. Estos resultados sugieren que las enzimas del ciclo TCA pueden intervenir no sólo en la función del nódulo, sino también en su morfogénesis [180].

5.2.3.2. El ciclo DCA

De todas formas, la rama descarboxilante del ciclo TCA tampoco resulta imprescindible, en términos metabólicos, para el funcionamiento del nódulo, ya que la regeneración del oxalacetato puede producirse mediante la operación del ciclo de los ácidos dicarboxílicos (DCA). Este es un ciclo que tiene dos enzimas clave: la isocitrato liasa, que cataliza la escisión del isocitrato en succinato y glioxilato, y la malato sintasa, que cataliza la condensación del glioxilato con el acetil-CoA para dar malato. Ambas enzimas han sido detectadas en los bacteroides de *B. japonicum* [313].

5.2.3.3. El ciclo del ácido γ -aminobutírico (GABA)

Otra vía que obvia una de las reacciones descarboxilantes del ciclo TCA es la vía del GABA, que partiendo del α -cetoglutarato rinde succinato, a través de la producción de glutamato, GABA y succinato semialdehído. Para el funcionamiento de esta vía es necesaria, primero, la aminación de α -cetoglutarato hasta glutamato. Salminen y Streeter [312] han demostrado que una parte significativa del carbono que entra en el ciclo TCA es convertido en glutamato y Fottrell y Mooney [112] demostraron que el amonio y el α -cetoglutarato inducen muy eficazmente la cetoglutarato dehidrogenasa y la aspartato aminotransferasa. En los bacteroides el amonio debe ser abundante debido a la acción de la nitrogenasa y, si debido al ambiente microaerófilo, se inhibe o se reprime la α -cetoglutarato dehidrogenasa, podría producirse también una acumulación del cetoácido, por lo que es posible la formación de glutamato por aminación del α -cetoglutarato. El glutamato formado podría cumplir una primera función consistente en donar los grupos

amino para el funcionamiento de la lanzadera malato-aspartato, ya comentada, pero también podría ser descarboxilado para formar GABA que se produce muy abundantemente en el nódulo [45,203] y que luego sería desaminado y oxidado hasta succinato [181,226]. Esta vía sería un procedimiento para retirar α -cetoglutarato del ciclo TCA obviando la acción de la α -cetoglutarato dehidrogenasa, pero eliminando una cantidad equivalente de CO_2 y rindiendo succinato, otro intermediario del ciclo.

Para que la vía opere es necesaria, como queda dicho, la aminación del α -cetoglutarato hasta glutamato, que puede estar catalizada por dos sistemas enzimáticos diferentes, la glutamato dehidrogenasa o la glutamina:2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT) y ambas han sido detectadas en los bacteroides de *B. japonicum* [40,86], por lo que resulta muy probable la existencia de esta vía. Es más, se ha sugerido que en los bacteroides de *B. japonicum* puede ser la principal vía catabólica para el glutamato [199] y se han aislado mutantes de *R. meliloti* defectivos en esta vía, que si bien forman nódulos de apariencia normal tienen menor actividad nitrogenasa [111].

5.2.3.4. Metabolismo del piruvato

Ya hemos visto cómo el piruvato sirve de metabolito cebador de los ciclos TCA y DCA mediante su descarboxilación a acetil-CoA. Sin embargo, en las condiciones microaerófilas del nódulo son posibles vías fermentativas para la transformación de este metabolito. Una de ellas sería su conversión en alanina por la alanina dehidrogenasa [16], aunque esta enzima no se encuentra en los nódulos de alfalfa y las altas concentraciones de este aminoácido existentes en los bacteroides debe ser atribuida a la actividad de la glutamato:piruvato aminotransferasa [85]. Existe también la posibilidad de que el piruvato sea reducido a lactato por la lactato dehidrogenasa, ya que esta enzima ha sido detectada en los nódulos de alfalfa [85] y los bacteroides de soja incubados en condiciones microaerófilas acumulan lactato [346].

En los bacteroides de *B. japonicum* se han detectado las actividades aldehído dehidrogenasa [344] y alcohol dehidrogenasa [313]; además, en condiciones anaerobias la alcohol dehidrogenasa procedente de extractos de bacteroide favorece la producción de etanol [347] y, dado que los bacteroides forman acetato cuando se incuban en anaerobiosis y en ellos no existe piruvato descarboxilasa [347], se puede postular que el piruvato es descarboxilado a acetil-CoA, que posteriormente se transforma en acetato por la acetil-CoA sintasa [279]. A continuación la acetaldehído dehidrogenasa convertiría el acetato en acetaldehído y la alcohol dehidrogenasa completaría la reducción hasta etanol.

Los bacteroides de *B. japonicum* y de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* acumulan grandes cantidades de poli- β -hidroxibutirato que pueden suponer hasta el 50 por ciento del peso seco y que se pueden poner de manifiesto mediante microscopia electrónica [385]. La síntesis de este polímero que comienza cuando se establecen las condiciones microaerófilas en el nódulo, se inicia por la condensación de dos unidades de acetyl-CoA para formar acetoacetyl-CoA, que se reduce a β -hidroxibutiril-CoA, cuya polimerización da lugar al PHB. se trata, pues, de un proceso reductor. Ahora bien, dado que en condiciones de microaerofilia la nitrogenasa consume grandes cantidades de energía y de electrones, es razonable preguntarse qué función cumple en el bacteroide la síntesis de PHB. McDermott y col. [226] especulan que en las condiciones microaerófilas del nódulo se acumularía reductor, es decir, habría una alta relación NAD(P)H/NAD(P), que inhibiría o reprimiría a enzimas tales como la isocitrato dehidrogenasa, la cetoglutarato dehidrogenasa o la citrato sintasa, lo que provocaría una acumulación de acetyl-CoA que se derivaría a la síntesis de PHB; el proceso, restablecería, asimismo, una relación NADH/NAD favorable para el funcionamiento de las mencionadas enzimas, que, como ya se ha indicado, resultan clave para la actividad y el desarrollo del nódulo (apartado 5.2.3.1). En efecto, coincidiendo con la síntesis de PHB se observa una caída, aproximadamente del 25 por ciento, en la actividad de NADP-isocitrato dehidrogenasa [187,344].

Coincidiendo con el inicio de la síntesis de PHB se han detectado incrementos de la actividad β -hidroxibutirato dehidrogenasa [186,385] y, dado que esta enzima suele intervenir en la degradación del polímero, su actividad implicaría un recambio constante de PHB, pero con una acumulación neta del polímero [226].

Hemos de mencionar que no en todas las simbiosis se produce una acumulación de PHB. Si bien ésta tiene lugar de forma general en los bacteroides de *Bradyrhizobium*, los de *Rhizobium*, con la única excepción ya citada de *R. leguminosarum* bv *phaseoli*, no acumulan tal polímero o lo hacen en menor grado que los bradirizobios. Esto no es más que una comprobación adicional de las profundas diferencias metabólicas que existen entre los dos géneros.

5.3. Metabolismo nitrogenado

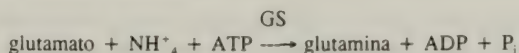
Como en el caso del metabolismo del carbono, conviene recordar aquí que las células infectadas que forman parte del nódulo radical se encuentran compartimentadas y que las diversas transformaciones que llevan a cabo sobre el nitrógeno tienen lugar en diferentes compartimentos: en el bacteroide tiene lugar

la producción de amonio, como consecuencia de la actividad catalítica de la nitrogenasa sobre la molécula de dinitrógeno. Sin embargo, no es ésta la única fuente de amonio en el nódulo, sino que en éste tienen lugar otros procesos productores de amonio. En primer lugar, puede proceder de los nitratos, que llegan al nódulo directamente desde el suelo por absorción a través de la superficie o desde el xilema de la raíz a través de conexiones con el sistema vascular del nódulo [213]. Estos nitratos son reducidos en el nódulo hasta amonio por acción de dos enzimas, la nitrato reductasa y la nitrito reductasa que se encuentran tanto en el citosol de la célula infectada como en el bacteroide. Por otra parte, en el metabolismo intermediario del nódulo se producen reacciones de desaminación, de hidrólisis y otras, que acaban rindiendo amonio, que, junto con el procedente de la reducción de los nitratos, sirve para aumentar el contenido de amonio del nódulo radical. Desde hace tiempo es conocido el hecho de que la mayor parte del amonio producido en los bacteroides pasa al citosol de la célula infectada, donde es asimilado por enzimas del vegetal porque, aunque los bacteroides tienen las enzimas necesarias para la asimilación del amonio, éstas se encuentran reprimidas o en muy baja actividad [24,40,165], por lo que el amonio debe ser excretado rápidamente. En efecto, desde hace unos veinticinco años se sabe que los bacteroides aislados que reducen $^{15}\text{N}_2$ liberan al medio la mayor parte del [^{15}N]amonio liberado [19] y, de forma similar, los rizobios que, en vida libre, son inducidos a fijar activamente el nitrógeno *in vitro*, también pierden amonio al medio extracelular [20,254,360]. Por el contrario, las enzimas equivalentes de la fracción vegetal del nódulo se inducen paralelamente a la actividad de la nitrogenasa y asimilan activamente el amonio producido por ésta [28,133,293].

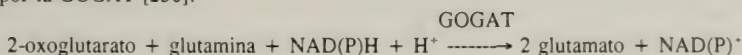
Los rizobios y otras muchas bacterias diazotrofas poseen transportadores de amonio que sólo se expresan en condiciones limitantes de nitrógeno [128,129,166,177,254,263]. Sin embargo, ni en las membranas de los bacteroides ni en la membrana peribacteroidea, se expresan tales transportadores y, por ello, el amonio atraviesa ambas membranas por difusión simple [166,177,254,364], que viene favorecida por la alta tasa de su asimilación en el citosol de la célula infectada.

Como consecuencia de esta asimilación, se forman en las células del nódulo una serie de compuestos nitrogenados que son exportados por el xilema [265,266] hasta las partes aéreas de la planta, donde son utilizados como donadores de nitrógeno reducido para la síntesis de los compuestos nitrogenados necesarios para el crecimiento. Como ya se ha indicado, las leguminosas pueden ser divididas en dos grupos según el tipo de nódulos que presentan y el tipo predominante de compuestos que transportan a través del xilema: las exportadores de amidas, que forman nódulos indeterminados y transportan asparagina, glutamina o metilén-glutamina, y las exportadores de ureidos, que forman nódulos determinados y transportan alantoína, ácido alantoico o citrulina [320]. Ahora bien, cualquiera que sea el tipo de moléculas que se transporten, antes tiene lugar una asimilación primaria del amonio, que rinde

glutamina, por acción de la glutamina sintetasa (GS) y la glutamina 2:oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT), también denominada glutamato sintasa [28,40]. El amonio es incorporado al carbono gamma del ácido glutámico, formándose la amida correspondiente, la glutamina, en una reacción dependiente de ATP y catalizada por la glutamina sintetasa:

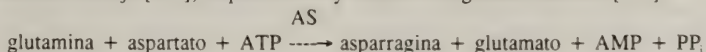


En apoyo de la intervención de esta enzima están los hechos siguientes: 1) utilizando ^{15}N y ^{13}N , se ha demostrado que el amonio se incorpora rápidamente en forma de glutamina [230], y 2) esta incorporación es bloqueada por un inhibidor específico de la glutamina sintetasa, la metionina sulfomixina (MSO), que provoca un rápido incremento en la concentración de $^{15}\text{NH}_4^+$ en el nódulo [230]. El nitrógeno incorporado como grupo amida en la glutamina es seguidamente transferido al carbono 2 del ácido oxoglutarico, para formar glutamato. Esta reacción, dependiente de nucleótidos de piridina reducidos, es catalizada por la GOGAT [230]:



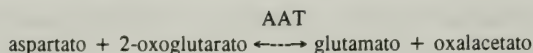
La intervención de esta enzima también se ha puesto de manifiesto mediante el empleo de ^{15}N y de inhibidores, en este caso, la azaserina que es un inhibidor de las reacciones de transferencia de grupos amida [255,368]. Las dos enzimas necesarias para esta asimilación primaria del amonio han sido aisladas y purificadas del nódulo [27,56,134,229]. La GS se localiza exclusivamente en el citosol, mientras que la GOGAT está tanto en el citosol como en plastos [11,30,328,329]. Ambas se inducen durante el desarrollo del nódulo [10,29,135,298,299,319].

Aunque la glutamina, el primer producto de la asimilación del amonio, se encuentra normalmente en los exudados del xilema de las leguminosas productoras de amidas, no es, ni mucho menos, el compuesto mayoritario. Lo es la asparragina [4,190,204,340,385], compuesto más soluble y metabólicamente menos activo que la glutamina. De las diversas vías metabólicas que existen en los vegetales superiores para la síntesis de asparragina, se ha demostrado que la que opera en el nódulo radical es la reacción catalizada por la asparragina sintetasa (AS), enzima que ha sido aislada y purificada de los extractos de nódulos de soja [167], requiere ATP y cataliza la siguiente reacción [117]:



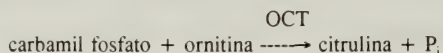
El ácido aspártico necesario para la anterior reacción es generado por acción de la aspartato

aminotransferasa (AAT), que como se ha indicado se encuentra ampliamente distribuida en los nódulos radicales de las leguminosas [104,105] y cataliza la siguiente reacción reversible:



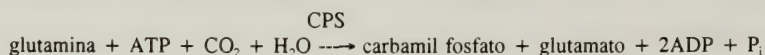
En la leguminosa tropical *Arachis hypogaea*, se ha encontrado un aminoácido no proteico, la amida 4-metilénglutamina, que puede llegar a suponer hasta el 90 por ciento de los exudados del xilema [113,114]. El mecanismo de síntesis de esta amida no está claro, porque, si bien se ha aislado de los cotiledones de cacahuete una metilénglutamina sintetasa específica [381], que cataliza una reacción similar a la de la glutamina sintetasa, pero utilizando metilénglutamina como aceptor y formando AMP y PP_i; sin embargo, hasta ahora no ha sido posible aislar esta enzima de los nódulos de esta planta.

En el otro grupo de leguminosas, los productos mayoritarios obtenidos como consecuencia de la actividad fijadora de dinitrógeno no son aminas, sino ureidos. Así, en las especies de *Alnus* [239] y de *Casuarina* [374] el compuesto nitrogenado más abundante en los nódulos, en las raíces, en los tallos, en las hojas y en el exudado del xilema es la citrulina, cuya procedencia del amonio asimilado en el proceso fijador se ha demostrado mediante la utilización de ¹⁵N y ¹⁴CO₂, que demuestran que ambos marcadores se incorporan rápidamente en citrulina, a una tasa muy similar a la de la fijación del dinitrógeno [118,225]. Se sabe muy poco sobre la síntesis de citrulina en los nódulos, pero en otros tejidos vegetales este ureido se forma normalmente mediante una reacción entre el carbamil fosfato y la ornitina, que está catalizada por la ornitin carbamil transferasa (OCT):



Ahora bien, como la ornitina se produce a partir del glutamato [351], la síntesis de citrulina requiere un mecanismo anaplerótico que produzca α-cetoglutarato para la síntesis de glutamato. Esta vía es la asimilación del CO₂ por la fosfoenolpiruvato carboxilasa, que produce oxalacetato. Este cetoácido entraría en el ciclo TCA y produciría el cetoglutarato [225].

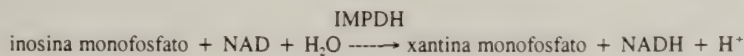
Por su parte, el carbamil fosfato se forma por acción de la carbamil fosfato sintetasa (CPS), que cataliza una reacción de asimilación de CO₂, que requiere ATP y glutamina como donador de nitrógeno, que en este caso procede del grupo amida [225]:



Los otros dos ureidos detectados en el floema del segundo grupo de leguminosas, la alantofna y el ácido alantoico, son compuestos estructuralmente relacionados y se forman en una misma vía bioquímica. Mothes [245] y Reinbothe y Mothes [289] propusieron que estos ureidos podrían formarse por cualquiera de las dos vías siguientes: 1) condensación entre la urea y un compuesto de dos carbonos como el glioxilato o la glicina, y 2) catabolismo oxidativo de las purinas. Aunque el último de estos autores sostenía que la segunda de las vías era altamente improbable, en la actualidad se tiene la certeza de que es precisamente éste el mecanismo de formación de alantofna y ácido alantoico en el nódulo radical, como consecuencia de las siguientes observaciones: 1) las enzimas del catabolismo de purinas (xantina dehidrogenasa, uricasa y alatoínasa) se encuentran en niveles muy elevados en los nódulos de *Vigna unguiculata* [7,8,10], *Glycine max* [115,116,319,348] y *Phaseolus vulgaris* [290,292,349,350], que son leguminosas transportadoras de ureidos; 2) normalmente, los niveles de estas enzimas son bajos en leguminosas exportadoras de amidas, como *Lupinus luteus* [290,292] y *Pisum sativum* [60]; 3) los niveles de estas enzimas aumentan cuando se dispara la fijación de N₂, la actividad asimilatoria de amonio y la exportación de ureidos en el nódulo [7,8,10,292,319]; 4) la adición de alopurinol, inhibidor irreversible de la xantina dehidrogenasa, tiene como consecuencias una disminución en los niveles de ureidos en el nódulo y en la salida de estos compuestos al xilema, así como un incremento en los niveles nodulares de xantina [7,8,115,354], y 5) los extractos libres de células obtenidos a partir de nódulos convierten en ureidos intermediarios como la inosina monofosfato (IMP), la xantina monofosfato (XMP), la xantina y la hipoxantina y también en este caso, el alopurinol inhibe esta conversión [354,386,387].

Aunque las purinas que dan lugar a los ureidos pueden proceder de la degradación del ADN y el ARN, en los nódulos se sintetizan *de novo* en una vía que implica la intervención del fosforibosilpirofosfato (PRPP), la glutamina, el ácido aspártico, CO₂, glicina, metenil tetrahidrofolato y fórmil tetrahidrofolato [9,10,290,292,321], dando como primer producto la inosina monofosfato, a partir de la cual se forman la alantofna y el ácido alantoico.

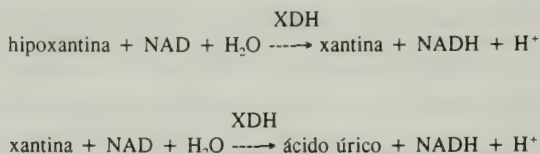
La inosina monofosfato es convertida en xantina monofosfato por una reacción catalizada por la inosina monofosfato dehidrogenasa (IMPDH) [31,291]:



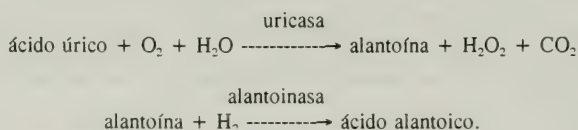
Esta enzima ha sido aislada y purificada de los nódulos de *Vigna unguiculata* y tiene localización citosólica, si bien en los nódulos de *Glycine max* se encuentra en plastos [32].

A continuación, la xantina monofosfato es convertida en xantosina por acción de una 5' nucleotidasa y en xantina por acción de una nucleosidasa [32] y el siguiente paso es la oxidación de la xantina hasta

ácido úrico, por acción de la xantina dehidrogenasa (XDH), que también puede catalizar la oxidación de la hipoxantina, intermediario en el catabolismo oxidativo de las purinas [144]:



Por último, el ácido úrico es convertido en alantoina por la uricasa y ésta en ácido alantoico por la alantoinasa [144]:



6. El simbiosoma como orgánulo lítico. ¿Una función para el ácido indol acético?.

Para completar la visión sobre el funcionamiento del nódulo radical conviene reparar en la naturaleza del simbiosoma. Como es sabido, la endocitosis de bacterias Gram negativas por células eucarióticas suele terminar con la fusión del fagosoma y los lisosomas y la digestión de la bacteria. Ahora bien, se ha propuesto que cuando el fagosoma carece de receptores para el lisosoma se produce una endosimbiosis [53], que podría haber sido el punto de arranque del proceso endosimbiótico que condujo a la adquisición de las mitocondrias y los cloroplastos [53,379].

En el caso de la endosimbiosis fijadora de nitrógeno, ya se ha indicado que los bacteroides se encuentran encerrados en orgánulos, simbiosomas, rodeados por una membrana cuya naturaleza no está, en absoluto clara. Para algunos autores, la membrana peribacteroidea procede de la invaginación de la membrana citoplasmática [18] con varias nodulinas ancladas a ella [272], pero para otros, esta interpretación es discutible. Así, Mellor y Werner [237] consideran al simbiosoma como un orgánulo temporal e independiente, recogiendo y ampliando la anterior sugerencia de Truchet y Coulomb [356] para los que los bacteroides habitan "fitolisosomas". Después de eso, se ha ido acumulando evidencia bioquímica que apoya la idea de que el simbiosoma es un orgánulo muy semejante a los lisosomas y, por consiguiente, con una función lítica. Las principales pruebas que apoyan esta idea son las derivadas de la comparación de las proteínas peribacteroideas y las de los lisosomas. En el espacio peribacteroideo de diversas leguminosas existen α -manosidasa [235], enzima que suele ser considerada como un marcador vacuolar

[33], así como proteasa ácida [235], trealasa [189,232,241,311]. De estos datos se concluye que el simbiosoma y el lisosoma son orgánulos similares [233].

Ahora bien, esta interpretación plantea el problema de cómo el bacteroide resiste la acción de las enzimas líticas existentes en el simbiosoma y cómo la entrada del endosimbionte en el simbiosoma no termina con su digestión como ocurre en el caso de otras bacterias Gram negativas cuando se encuentran en el fagolisosoma. En el caso de algunas estirpes, sobre todo mutantes *fix*, la microscopia electrónica revela que los bacteroides sufren una digestión muy rápida [15,378], lo que prueba que, para el establecimiento de una simbiosis estable, deben existir mecanismos para proteger a los bacteroides de los efectos del compartimento lítico en que se encuentran. Uno de ellos puede ser la existencia de inhibidores de proteasa, que son moléculas que controlan la proteólisis [201]. En los vegetales los inhibidores de proteasa se encuentran en vacuolas [373] o en determinados tipos de lisosomas como los cuerpos proteicos [161]. En el caso de los nódulos de soja se ha encontrado una proteína de 18-20 kDa que es inhibidor de la termolisina, una proteasa [121] y, dado que en los cotiledones se encuentra una proteína similar [121], no debe tratarse de una nodulina.

Una característica que tienen los lisosomas es su acidez y también en esto, el simbiosoma y el lisosoma se asemejan. La acidez del primero es debida a varios factores. En primer lugar, al transporte de ácidos dicarboxílicos [388] y, en segundo lugar, por la acción de una ATPasa existente en la membrana peribacteroidea que provoca la entrada de protones hacia el simbiosoma [363]. Por otra parte, es sabido que los rizobios son bacterias muy poco tolerantes a la acidez [131,191,248]. Por consiguiente, los bacteroides han de poseer también mecanismos que contrarresten esta acidificación continua del simbiosoma y que eviten que éste llegue a convertirse en un compartimento netamente lítico [183]; uno puede ser el consumo de dicarboxilatos para la respiración [35] y el otro, la excreción de amonio procedente de la actividad de la nitrogenasa [36].

Es interesante detenerse un poco a considerar la función de la ATPasa existente en la membrana peribacteroidea. Se trata de una enzima similar a la existente en la membrana citoplasmática de las células del vegetal y su función es la creación de un gradiente de protones, importándolos al simbiosoma con consumo de ATP, a fin de mantener a la membrana peribacteroidea en un estado energético que permita el paso de solutos a través de ella. Una función adicional sería mantener la electroneutralidad durante el transporte de aniones como el malato [363]. Si ello es así la actividad de esta ATPasa puede resultar imprescindible para el mantenimiento de la simbiosis eficaz, y en ello podría resultar útil la producción de auxinas vegetales por parte del microsimbionte.

Desde hace tiempo se sabe que los rizobios producen simbióticamente ácido indol acético (AIA) y que éste se acumula en el nódulo que tiene concentraciones de la auxina superiores a las detectables en

el resto de los tejidos [171]. Asimismo, se ha comprobado que la producción de AIA por los rizobios responde a los mismos inductores que los genes *nod*, responsables de la nodulación [281]. Sin embargo, su papel en el establecimiento y funcionamiento de la simbiosis es incierto. Kaneshiro y Kwolek [182] aislaron mutantes de *Bradyrhizobium* hiperproductores de AIA que producen mayor número de nódulos que la estirpe silvestre y también se ha propuesto que la auxina revierte la acción inhibitoria de los nitratos sobre el crecimiento y la función del nódulo [330]. Nosotros planteamos una hipótesis alternativa, que está basada en la capacidad del AIA para provocar la excreción de protones a través de las membranas de las células vegetales activando las ATPasas existentes en ellas [142,284,285] que ha dado origen a la denominada teoría del crecimiento ácido [286]. El papel de la auxina en el funcionamiento de la simbiosis podría consistir en la activación de la ATPasa de la membrana peribacterioidea para mantener el gradiente de protones a su través y la acidificación del simbiosoma. En apoyo de esta idea está su capacidad para revertir la inhibición por nitratos, ya que éstos desacoplan la actividad de la mencionada ATPasa y el transporte de metabolitos al simbiosoma y por, ello, inhiben la fijación del nitrógeno [363]. La acidez del simbiosoma serviría, a su vez, para mantener un gradiente de protones entre éste y el bacterioide incrementando la fuerza protón-motriz necesaria para la síntesis del ATP que soporta la actividad de la nitrogenasa.

Sin embargo, para tener evidencia directa del papel del AIA en éste y otros aspectos de la simbiosis es imprescindible la obtención de mutantes incapaces de producir la enzima, a fin de ensayar su comportamiento simbiótico. Estos mutantes son difíciles de obtener, debido a la vía de producción de la auxina. En efecto, el AIA se produce como consecuencia de la oxidación espontánea del ácido indol pirúvico producido en la desaminación del triptófano por acción de aminotransferasas específicas para aminoácidos aromáticos [269]. Por consiguiente, cualquier estrategia para obtener estos mutantes exige la obtención de estirpes carentes de estas transaminasas y ello se ve dificultado por el hecho de que, generalmente, los rizobios contienen más de una de tales enzimas [194,269,270]. Nosotros disponemos de una estirpe de *Bradyrhizobium* (*Chamaecytisus*) que sólo tiene una de estas transaminasas [138] y que, por ello, resulta muy apropiado para la obtención de los mencionados mutantes AIA⁻.

7. ¿Por qué sólo las leguminosas?

Como ya se ha indicado, los rizobios sólo infectan a las leguminosas y cada estirpe bacteriana concreta lo hace a una gama también concreta de leguminosas hospedadoras, existiendo estirpes de gama amplia de hospedadores (pueden infectar a muchas plantas diferentes), o de gama estrecha (por el contrario, infectan un conjunto reducido de leguminosas) [389]. Durante mucho tiempo se ha especulado sobre las

bases moleculares de esta especificidad y pronto se supuso que era consecuencia de un intercambio de señales entre ambos miembros de la asociación simbiótica. Sin embargo, hasta que no ha sido posible la manipulación genética de los dos, no se ha podido tener una visión más o menos clara de la secuencia de eventos iniciales que conducen a la infección [215] y actualmente se sabe que en este intercambio de señales se encuentra la base de la especificidad, que está controlado por genes, tanto de la bacteria como de la leguminosa hospedadora. Esta libera una serie de compuestos que actúan como señales para inducir la expresión coordinada de los genes bacterianos necesarios para la nodulación. Estos genes, de los que se han identificado más de cuarenta [338], reciben el nombre de genes *nod* y, como su número es mayor que el de letras del alfabeto, reciben también el nombre de genes *nol* [310]. Estos genes codifican las enzimas necesarias para la síntesis de los denominados factores Nod, que son oligosacáridos sustituidos que provocan cambios morfológicos en la raíz de la planta y actúan también como determinantes de la gama de hospedadores de un estirpe concreta de rizobio.

En todas las especies de *Rhizobium* estudiadas hasta ahora, los genes *nod* se encuentran localizados en los plásmidos simbióticos, mientras que en *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, son de localización cromosómica y en los tres casos, se encuentran agrupados en diferentes operones y se regulan de forma coordinada por el regulón *nod* [262]. El análisis genético ha permitido dividirlos en tres grupos: genes *nod* comunes, genes *nod* específicos del hospedador (*hsn*), y genes *nod* específicos del cultivar o del genotipo (CSN o GSN) [355].

7.1. Genes *nod* comunes

Los genes comunes de la nodulación son un conjunto de genes *nod* que se encuentran estructural y funcionalmente muy conservados en la mayor parte de los rizobios estudiados, como se deduce de los estudios de secuenciación de ADN [94,305,353], de mutagénesis con el trasposón Tn5 [80], análisis de complementación [69,110,163,175] y el análisis de los productos génicos [84,94,318]. Estos estudios han permitido identificar en *Rhizobium*, que es el género mejor estudiado en este sentido, tres conjuntos de estos genes comunes: los genes *nodABC*, que son esenciales para la curvatura del pelo radical y el comienzo de las divisiones celulares, los genes *nodIJ*, que están situados dirección abajo del gen *nodC*, y el gen regulador *nodD*, que precede a los anteriores y se transcribe en dirección opuesta a éstos [47]. Las mutaciones de los genes *nodABC* bloquean por completo la nodulación y todas producen un fenotipo similar: las bacterias mutadas en cualquiera de estos genes casi no promueven curvatura del pelo radical (fenotipo Hac⁻) ni divisiones celulares [214]. Por su parte, las mutaciones en *nodD* dan el mismo fenotipo, pero ello se explica por la función reguladora que, como se verá, ejerce *nodD* sobre *nodABC*. Este papel

regulador del gen *nodD* se ve apoyado por el hecho de que a partir de su secuencia de nucleótidos se puede deducir que su producto en *R. leguminosarum* tiene homología con el dominio de unión al ADN de la proteína reguladora *araC* de *E. coli* [327]. Como han sugerido Wijffelman y col. [380], es probable que se trate de un "filtro molecular" que reconoce concentraciones de compuestos reguladores (activadores e inhibidores) liberados por una leguminosa concreta. El gen *nodC* codifica una proteína hidrófoba que, según se desprende de datos inmunológicos y bioquímicos, debe ser una proteína integral de la membrana implicada en el reconocimiento de señales en la misma [178]. La proteína NodA también debe localizarse en la membrana y se produce en pequeñas cantidades en las células de *R. meliloti* [95].

Las mutaciones en los genes *nodIJ* sólo producen defectos marginales en el fenotipo de la nodulación, que en *R. trifolii* pueden traducirse en un ligero retraso en la aparición del nódulo [262], una curvatura exagerada del pelo radical (fenotipo Hac+ +) [80] y en ocasiones a la formación de tubos de infección cortos y abortivos [80]. En *R. meliloti* las mutaciones en *nodIJ* provocan una proporción anormalmente alta de pelos radicales curvados e infectados, que no afectan al número de nódulos; es más, se ha comprobado que estas mutaciones retrasan la nodulación [262]. El análisis de la secuencia de ADN demuestra que la proteína del gen *nodI* guarda una homología significativa con una familia de proteínas que ligan ATP e intervienen en diversos procesos de la biología de muchas bacterias [153], la mayor parte de las cuales se encuentran localizadas en la membrana citoplasmática de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* y normalmente intervienen en el transporte activo de compuestos de bajo peso molecular como histidina, maltosa, oligopéptidos, fosfato y ribosa [153]. Por su parte, el producto del gen *nodJ* es una proteína hidrófoba y forma parte integral de la membrana [99].

7.2. Genes *nod* específicos del hospedador

Los genes *nod* que controlan la especificidad por el hospedador (antes denominados genes *hcn*) son los que controlan la especificidad de una bacteria por una leguminosa concreta. Estos genes se han identificado siguiendo dos criterios: por un lado, se trata de los genes que hay que introducir en una especie concreta de rizobio para hacerla infectiva en leguminosas que, normalmente, son infectadas sólo por el rizobio donador y, por otro, son genes cuyas mutaciones alteran la gama de hospedadores de un rizobio y no pueden ser complementadas introduciendo los genes correspondientes (y, en ocasiones, con un alto grado de homología) procedentes de otra especie [78]. Con estos criterios se han caracterizado con detalle los genes *nodFEGH* de *R. meliloti* y *nodFE* de *R. leguminosarum* y *R. trifolii*. Así, por ejemplo, en *R. trifolii* las mutaciones en los genes *nodFE* tienen como consecuencia una alteración de la gama de hospedadores: mientras que la estirpe silvestre infecta rápidamente diversas razas de trébol, los mutantes

nodFE nodulan muy débilmente al trébol blanco y al rojo [80] y, en contraste con la estirpe parental, infectan guisantes; aunque provocan la formación de tubos de infección en el trébol subterráneo, la infección no culmina con la formación de nódulos. Estos resultados indican que los genes *nodFE* controlan la especificidad por el hospedador y son dominantes sobre otros genes *nod* específicos de hospedador. Demuestran, asimismo, que las plantas de trébol blanco impiden la nodulación por los mutantes, y las de guisante impiden la infección por las estirpes silvestres (pero no por las mutantes) de *R. trifolii*.

7.3. Productos de los genes *nod*

Los genes *nod*, tanto comunes como específicos de hospedador, controlan la producción de un factor (denominado factor Nod) de naturaleza glicolípídica que provoca la deformación del pelo radical y las divisiones celulares de la leguminosa compatible. El primero que se identificó fue el denominado factor NodRm-1 [211], que es un factor Nod producido por *R. meliloti*. Se trata de un tetrasacárido de residuos de D-glucosamina unidas por enlace β (1 $\rightarrow$ 4), que está sulfatado y tiene acetilados tres de los grupos amino. El extremo no reductor de la molécula contiene un ácido graso no saturado de 16 átomos de carbono, y el extremo reductor, un grupo sulfato. Posteriormente, se han aislado otros diversos factores Nod producidos por *R. meliloti* y otras especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* y se ha propuesto una nomenclatura uniforme para ellos [301]. Por ejemplo, el factor NodRm-1 ahora se denomina NodRm-IV(S). Rm significa *R. meliloti*, IV indica los cuatro residuos de glucosamina y S, el grupo sulfato localizado en el extremo reductor de la molécula. Los factores Nod de *R. leguminosarum* bv *viciae* pueden ser tetra o penta glucosaminas, están acetilados y carecen de grupos sulfato; se designan como Rlv-IV(Ac) o Rlv-V(Ac). En *R. meliloti* se han detectado varios factores Nod; todos tienen una estructura básica similar a la de NodRm-1, pero algunos carecen de grupo sulfato [211], otros están formados por cinco residuos de glucosamina [322] y otros por sólo tres de estos residuos [322]. Al menos existen cinco factores Nod producidos por *R. leguminosarum* y la diferencia más evidente con respecto a los producidos por *R. meliloti* es la carencia de grupos sulfato; los de *R. leguminosarum* bv. *viciae* difieren de NodRm-1, además, en la longitud de la cadena carbonada existente en el extremo no reductor de la molécula: en este caso se trata de una cadena de 18 átomos de carbono y contiene cuatro dobles enlaces [335]; además, en el extremo no reductor existe un grupo Ó-acetilo [335]. Las estirpes de *Bradyrhizobium* también segregan factores Nod formados básicamente por glucosamina, pero que difieren de los de *Rhizobium* en la naturaleza de los sustituyentes; por ejemplo, en el extremo reductor hay un residuo de 5-*o*-metil-fucosa [156].

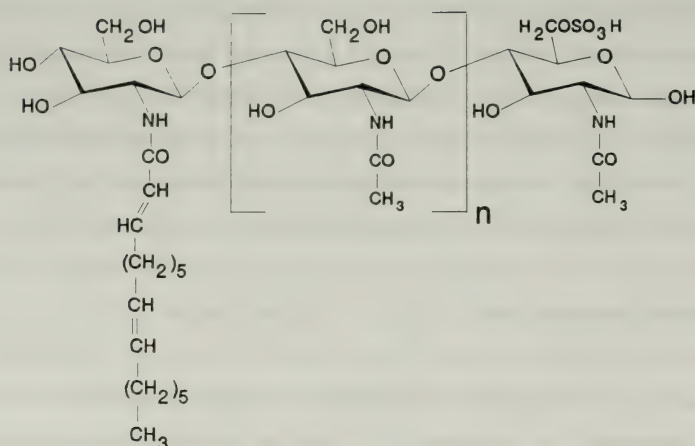


Figura 5. Estructura general de un factor Nod. n representa el número de residuos de glucosamina. El lípido localizado en el extremo de la molécula es típico de los factores Nod segregados por *R. meliloti*. Las flechas indican los papeles propuestos para cada gen *nod*.

La síntesis de estos factores Nod está controlada por los genes *nod*. En la figura 5 se expone la estructura general de los factores Nod conocidos hasta ahora y el presunto papel de los diversos genes *nod* en su síntesis. Por ejemplo, *nodC* que, al parecer, tiene una secuencia similar a la del gen de la quitín sintasa de levaduras [156], controlaría la unión por enlace $\beta(1 \rightarrow 4)$ entre los residuos de glucosamina, sintetizados bajo el control de *nodM*, cuya secuencia es homóloga con la del gen *glmS* de *E. coli*, que codifica la D-glucosamina sintetasa [12]. El producto de *nodL* acetilaría los residuos de glucosamina [83] y los genes *nodeF* controlarían la síntesis de ácido graso [162,327].

Cuando se tratan las raíces de alfalfa con una preparación purificada de cualquier factor NodRm provoca la deformación de los pelos radicales a la concentración 10^{-11} M, mientras que a una concentración 10^{-7} M estimula la división de las células corticales [358]. Sin embargo, las raíces de leguminosas que no son hospedadoras de *R. meliloti* como la arveja (*Vicia sativa*), no responden a la adición de NodRm-1 a esas concentraciones, aunque sus pelos radicales se deforman cuando son tratadas con factores Nod de *R. meliloti* que carecen de grupo sulfato, como NodRm-2 [211], o con factores Nod de pentaglicosamina a la concentración de 10^{-8} o 10^{-9} M [322], lo que, a nuestro juicio, demuestra que los factores Nod tienen la capacidad de disparar de manera específica los primeros estadios del proceso de nodulación y que esta especificidad depende de la estructura y composición química de cada factor.

7.4. Regulación de los genes *nod*

El único gen *nod* que se expresa de manera constitutiva es *nodD*, que se encuentra en todos los rizobios investigados hasta ahora. En muchos casos existe una sola copia de este gen, pero en otros constituyen una familia multigénica [3,64,159]. Dado que los genes *nodD* de las diferentes especies de *Rhizobium* se diferencian en su respuesta a los exudados de los diversos hospedadores y se manifiestan de una manera específica de especie [162,158] es probable que la presencia de diversos alelos *nodD* en una misma bacteria permita a ésta responder a los diversos inductores producidos por sus diversos hospedadores, haciendo de esta forma óptima su respuesta simbiótica [150,140,159]. Los demás genes *nod* sólo se expresan en presencia de la leguminosa compatible o de sus exudados radicales, lo que indica que la planta produce moléculas que actúan como señales para la inducción de estos genes.

La mayor parte de los operones *nod* inducibles están precedidos por unas secuencias consenso de 47 pares de bases, altamente conservadas, que se denominan cajas *nod* [306] o cajas de nodulación y son secuencias reguladoras en *cis* que coordinan la expresión de los operones *nod*. La proteína NodD se une, incluso en ausencia del inductor producido por la planta, a dos regiones de estas cajas *nod* [109] por medio del extremo amino terminal de la molécula, que está mucho más conservada que la mitad carboxilo terminal [162,307], lo que implica que esta mitad desempeña funciones diversas, como, por ejemplo, el reconocimiento de inductores diferentes [43,44,162], mientras que la mitad amino terminal sirve para la unión al ADN [327]. Sin embargo, este resultado está sometido a controversia porque algunos trabajos con mutantes dobles [44] y con genes *nodD* quiméricos [336] sugieren que la parte carboxilo terminal también se une al ADN y que NodD no consta de dos dominios separados. La proteína se encuentra localizada en la membrana y ello sugiere que su extremo carboxilo terminal mira hacia la parte externa de la célula a fin de reconocer los inductores, mientras que el extremo amino tienen una localización hacia el citoplasma y se encuentra unido a la caja *nod*.

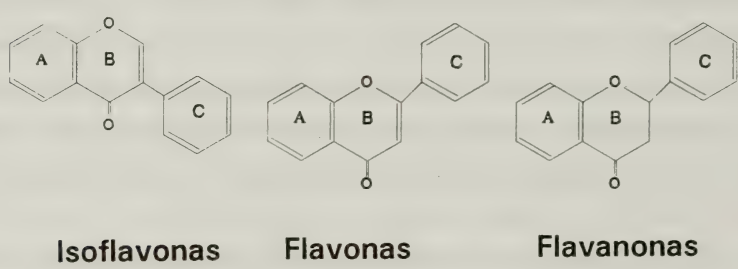
En *R. meliloti* se ha encontrado una proteína represora que actúa en *trans*, uniéndose a los promotores de *nodD* y disminuyendo de esta forma la cantidad de la proteína NodD disponible. De esta forma, en *R. meliloti* la transcripción de los operones *nod* inducibles se encuentra sometida, tanto a control positivo, ejercido por inductores secretados por la leguminosa hospedadora, y negativo, ejercido por la proteína represora. En otras especies de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* no se han encontrado proteínas de este tipo.

Con los datos que acabamos de describir, se han elaborado diversos modelos de regulación de la expresión de los operones *nod*: la proteína NodD se une a la caja *nod* incluso en ausencia del inductor (esta unión ha sido demostrada *in vitro* pero aún no ha sido confirmada *in vivo*) y, después de unirse al inductor

producido por la leguminosa hospedadora, experimenta un cambio conformacional [79,196] que le permite activar la transcripción. En el caso de *R. meliloti* esta activación debe impedir la unión de la proteína represora y promover el comienzo de la transcripción coordinada del regulón *nod* por medio de la ARN polimerasa [196,306]. Sin embargo, queda pendiente la respuesta a varias preguntas como, por ejemplo, mediante qué mecanismos se unen los inductores a NodD y cuáles son las modificaciones estructurales que ello provoca, cómo es la unión de NodD a la ARN polimerasa de la bacteria, o la posible función de NodD en estadios posteriores del desarrollo del nódulo.

7.5. Moléculas inductoras producidas por la planta hospedadora

Como queda dicho, los genes *nod* inducibles sólo se expresan en presencia de exudados radicales de la leguminosa compatible [70,215,389]. La última década ha estado dedicada, en parte, a la identificación de los componentes de los exudados que ejercen esta acción inductora, para lo que ha sido de gran utilidad la utilización de estirpes bacterianas que llevan la fusión *nod-lacZ* [79,130,272,287]. Estos trabajos recibieron un fuerte impulso cuando se demostró que algunos compuestos fenólicos sencillos liberados por tejidos vegetales heridos inducen la expresión de los genes *vir* de *Agrobacterium* spp. [339]; por otra parte, desde antiguo es conocido que las raíces de los vegetales exudan flavonoides [217], pero este hecho había pasado inadvertido porque no se concebía el modo en los microorganismos del suelo pudieran utilizar metabolitos producidos por otros seres vivos en cantidades traza [277]. Estos trabajos han conducido al descubrimiento de ciertos compuestos de los exudados radicales como inductores de los genes *nod*. En las simbiosis de climas templados, como alfalfa/*R. meliloti*, guisante/*R. leguminosarum* y trébol/*R. trifolii*, los inductores son flavonas, flavonoles y flavanonas sustituidas [108,271,287], así como chalconas [276], y en la simbiosis entre soja y *Bradyrhizobium*, isoflavonas sustituidas [197].



El hecho de que estos compuestos puedan ser aislados a partir de las semillas, plántulas en cultivo axénico o raíces indica que no es necesaria una señal bacteriana para la inducción de la producción de flavonas o isoflavonas. De hecho, estos compuestos se sintetizan como productos de la vía central de los fenilpropanoides existente en las plantas [146], son liberados al medio independientemente de su capacidad inductora de los genes *nod* de la estirpe de rizobio específica, y su naturaleza y la cantidad en que son producidos depende de la planta [141,271,275,302,390] y de su estado de desarrollo [148]. En los casos de la alfalfa, la judía o la soja, la gama de flavonoides exudados por las raíces es diferente de la de los que son producidos por las semillas [132,149,150,169,170,271]. Los flavonoides son liberados por la planta en forma de agliconas o de derivados glicosilados de baja actividad pero muy solubles [150,223] que son convertidos en la forma activa por acción de glicosidasas bacterianas [71]. Las sustancias inductoras son muy potentes y ejercen su acción a concentraciones del orden nanomolar y se consigue una inducción total a concentraciones comprendidas entre 10^{-6} y 5×10^{-6} M [391]. Con fines comparativos, se puede citar que los inductores de los operones del metabolismo de la lactosa y de la arabinosa actúan a concentraciones superiores en tres a cinco órdenes de magnitud [262].

Los diversos flavonoides producidos por la planta ejercen diferentes acciones sobre los genes *nod*. Así, en algunos casos, flavonoides que carecen de actividad inductora son inhibidores de la activación por parte de inductores eficaces [79,108,141,198,272]. Por regla general, los anti-inductores tienen la misma estructura que los inductores y la inhibición puede compensarse mediante la adición de concentraciones crecientes de éstos [272], por lo que pueden ser considerados con inhibidores competitivos [71], algunos de los cuales son también específicos y sólo actúan sobre estirpes bacterianas que son activadas por inductores producidos por leguminosas pertenecientes al mismo grupo de inoculación cruzada [198]. Por contra, también se ha detectado un efecto sinérgico entre flavonoides producidos por la misma planta [148,149,150] pero ello puede ser explicado teniendo en cuenta que en algunas especies existen varios alelos del gen *nodD*, de forma que un conjunto de varios de estos genes interactuando con diferentes inductores, tendría mayor actividad que uno solo [71].

Hasta hace relativamente poco tiempo, sólo se había podido detectar la capacidad de las plántulas (o las semillas) de las leguminosas para producir los flavonoides inductores o antiinductores bajo condiciones controladas del laboratorio, pero no se había detectado su presencia real en los ecosistemas naturales donde se supone que deben actuar. Recientemente, uno de nosotros [206] ha podido aislar de la rizosfera de alfalfa la formononetina-7-O-glucósido, que activa las proteínas NodD1 y NodD2 de *R. meliloti*.

Los flavonoides también pueden influir en los rizobios del suelo por mecanismos diferentes de la activación de los operones *nod*. Así, aunque *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son atraídos por compuestos

fenólicos que son nutrientes potenciales para estas bacterias [264,273], esta atracción también la ejercen, a muy baja concentración, compuestos como los flavonoides que pueden no tener valor como nutrientes [1,5,46,185]. En el caso de *R. meliloti*, la capacidad quimiotáctica de los flavonoides está estrechamente relacionada con su capacidad inductora y requiere la existencia de los genes *nodD* y *nodABC* activos [46]; por su parte, en *R. leguminosarum* y *R. phaseoli* esta correlación es menos evidente y la quimiotaxis es independiente de los genes *nod* [1,5]. Un hecho interesante es que el crecimiento de *R. meliloti* en medios mínimos se estimula fuertemente (el tiempo de duplicación se reduce a la quinta parte) cuando se añaden al medio a concentraciones micromolares luteolina u otros flavonoides producidos por el hospedador, con independencia de que sean o no inductores de los operones *nod* [148]. El mecanismo de esta estimulación del crecimiento es desconocido, pero, junto con la respuesta quimiotáctica puede contribuir a mantener una población elevada de la bacteria específica en la rizosfera de la leguminosa.

8. Aplicaciones agrícolas

Siendo las leguminosas uno de los grupos vegetales que contiene un mayor número de especies de interés para la nutrición humana y animal, no es de extrañar que, coincidiendo con el creciente interés científico por la fijación simbiótica del nitrógeno, se haya centrado la atención en los aspectos aplicados de la simbiosis entre estas plantas y las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Ya hemos indicado cómo el empleo de leguminosas, junto con el de los cereales, en agricultura se remonta a los tiempos más antiguos y cómo desde hace mucho tiempo se tiene conciencia del efecto beneficioso de la rotación de cultivos para el rendimiento de las cosechas. Por ello, esta práctica se ha extendido y en la actualidad puede ser considerada como habitual en la agricultura de la mayor parte de los países. Se tienen la tendencia a considerar a las leguminosas exclusivamente como fuente de alimentos. Si bien es verdad que son aprovechadas como forrajeras, y para la obtención de aceites y de granos para la alimentación humana y animal, no debe olvidarse que también son útiles para otros fines. Así, pueden ser utilizadas para la fertilización de pastizales, como abono verde, como plantas madereras y en silvicultura. El denominado abono verde es la forma de utilización que, en teoría, produce más beneficios para el terreno. Consiste en enterrar el cultivo de leguminosa al final de su ciclo de crecimiento y se trata de una técnica de abonado muy frecuente en los países tropicales y subtropicales, en los que la posibilidad de cultivar plantas en cualquier época del año facilita la introducción de abonos verdes en el intervalo que media entre los cultivos más importantes, como el arroz, la caña de azúcar y otros [324]. Las leguminosas arbóreas, como, por ejemplo, las del género *Acacia*, son utilizadas para la obtención de madera y, en silvicultura, también se ha demostrado la conveniencia de introducir leguminosas en las plantaciones de otros árboles. Por ejemplo,

Haynes y col., [151] describen un experimento muy interesante que consistió en introducir diversas especies de los géneros *Trifolium* y *Vicia* en plantaciones de *Platanus occidentalis* de tres años de edad. Cinco años después, la altura, el diámetro y el índice volumétrico de los árboles eran significativamente mayores que los de plantaciones control en las que no se habían introducido leguminosas. En el caso de los árboles cultivados conjuntamente con *Trifolium subterraneum*, el índice volumétrico quintuplicaba al de los árboles control. En Nueva Zelanda se ha introducido *Lupinus arboreus* en plantaciones de pino Monterey que se localizan en terrenos arenosos y muy improductivos; con ello se ha logrado disminuir la dependencia de estas plantaciones de abonos artificiales [119].

Ahora bien, aunque en condiciones naturales, las leguminosas pueden estar bien noduladas por estirpes de rizobios existentes en los suelos, las prácticas agrícolas tales como la introducción de monocultivos o la aplicación incontrolada de fertilizantes, de herbicidas y de pesticidas, pueden alterar la composición de la biota del suelo y provocar una pérdida de infectividad de los mismos. Por ello, salvo que se conozca la existencia previa de la estirpe de rizobio adecuada para la leguminosa que se desea cultivar, suele ser necesario introducir en el suelo la estirpe bacteriana específica, no sólo la primera vez, sino en ocasiones durante varios años, a fin de lograr que se establezca una población adecuada de la misma. Esta introducción puede hacerse inoculando directamente el suelo, o bien, inoculando las semillas antes de la siembra. generalmente, resulta más fácil y es más eficaz inocular las semillas, lo que suele hacerse bañándolas en una suspensión del inóculo (aproximadamente, 4 g por kg de semillas) en algún líquido adhesivo, como, por ejemplo, goma arábiga. Una vez secas, se puede proceder a la siembra. En muchos casos esta técnica es útil no sólo porque asegura una inoculación uniforme de cada semilla, sino porque al humedecerla, favorece la germinación. Sin embargo, en otros casos puede no ser de tanta utilidad: en ocasiones las semillas deben ser tratadas con fungicidas que resultan tóxicos para la bacteria; en otras veces, la semilla puede ser demasiado frágil (como la del cacahuete) para soportar el tratamiento o de tamaño demasiado pequeño (como en muchas especies de *Trifolium*) para conseguir en cada una de ellas un número de bacterias suficiente para asegurar una nodulación eficaz, y a veces, como en los casos de la soja y el altramuza, la envoltura de la semilla se separa de ésta en una etapa muy temprana de la germinación reduciendo la probabilidad de contacto de la bacteria con la nueva raíz. En estos casos puede ser más útil introducir el inoculante directamente en el suelo, inoculando una zona húmeda interna, que está por debajo de la superficie seca sobre la que se dispone la semilla. Cuando ésta germina, la raíz entra en contacto con la zona densamente poblada por los rizobios introducidos en las capas inferiores del suelo.

Es evidente que debe hacerse una cuidadosa selección de la estirpe de rizobio que se utiliza como inoculante. Es claro que esta estirpe debe ser capaz de infectar a la leguminosa en cuestión, pero, como regla general, debe hacerlo bajo una amplia gama de condiciones ambientales (acidez, salinidad, carencia

de agua, presencia de pesticidas, etcétera). Pero, además, debe ser capaz de competir con otras estirpes de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* que pudieran existir en el suelo y limitar la nodulación por la estirpe utilizada como inoculante. También son importantes factores biológicos del suelo, como la presencia de otros microorganismos, especialmente las micorrizas, ya que se ha demostrado que la simbiosis triple leguminosa-rizobio-micorriza aumenta la nodulación y la tasa de fijación de nitrógeno, sobre todo en suelos pobres en fósforo [14].

En general, se recomienda aumentar el cultivo de leguminosas con el fin de disponer de un adecuado suministro de alimentos proteicos. En efecto, aunque no hay un consenso general sobre la cantidad de proteína adecuada en la dieta humana, se estime que debe rondar los 70 gramos diarios, pero, lamentablemente, una parte importante de la población está muy por debajo de este consumo diario e, incluso, por debajo de los 36 g diarios que recomendaron en 1.973 la FAO y la OMS como mínimo absoluto para una persona de 65 kg de peso [119]. Admitiendo que la población mundial actual está en torno a 5.200 millones (datos de 1.990), la producción global de proteína debe ser de $1,3 \times 10^8$ toneladas al año. Esta cantidad se supera cada año [268], lo que sugiere que, en teoría, se produce suficiente proteína para alimentar a la población mundial. El problema, por un lado, radica en el reparto desigual de esta producción. Así, mientras en los países industrializados de Europa Occidental y Norteamérica hay una superproducción de alimentos proteicos, en los países subdesarrollados un elevado porcentaje de la población pasa hambre. Otro problema es que el mero dato de consumo de proteína por habitante no es suficiente, ya que no tiene en cuenta la composición en aminoácidos de las diferentes proteínas. Así, por ejemplo, la proteína de trigo es deficiente en lisina, mientras que la de las leguminosas lo es en metionina. Por consiguiente, las necesidades nutricionales del hombre se satisfacen mejor con una dieta proteica compuesta por una mezcla de cereales y leguminosas que por cualquiera de los dos tipos de vegetales. Teniendo en cuenta éstas y otras consideraciones, Hardy [147] ha propuesto duplicar hasta $2,6 \times 10^9$ toneladas al año la producción de cereales y cuadruplicar hasta 50×10^8 toneladas la de leguminosas. Sin embargo, el incremento del cultivo de leguminosas y su introducción en nuevos países tropieza con algunos obstáculos. Algunos de ellos son de naturaleza cultural. Muchas sociedades no tienen el hábito de cultivar y de consumir leguminosas y se resisten a adoptarlas como alimento básico. La idea, muy extendida en la sociedad occidental, de que las leguminosas son un alimento reservado a los menos pudientes ha determinado en gran medida la preferencia por la carne o el pescado como suplemento proteico a la dieta básica de cereales. El otro problema es de índole práctica y económica y deriva del hecho de que un aumento en la tasa de fijación de nitrógeno en un suelo lleva aparejado un incremento en el consumo de otros elementos como potasio, fósforo, calcio y azufre que hay que aportar si no se encuentran en cantidad suficiente para un rendimiento óptimo de las cosechas. También pueden convertirse en factores limitantes

el molibdeno, como parte constitutiva de la nitrogenasa, y el cobalto, constituyente de la leghemoglobina. En determinados suelos deficientes en estos elementos habrá de contemplarse la necesidad de su adición.

La clave para un uso más eficaz de las leguminosas es la formación del agricultor, que incluye una explicación racional de las ventajas de la rotación de cultivos, la inconveniencia de un aporte excesivo de abonos nitrogenados, la necesidad de lograr una infección eficaz, lo que implica introducir bacterias (la estirpe de *Rhizobium* o de *Bradyrhizobium* adecuada) en el suelo, bien directamente, bien inoculando las semillas y, por supuesto, sobre una adecuada comercialización de sus cosechas [119]. Ahora bien, debe tenerse en cuenta que las finalidades del aumento de producción de las cosechas son diferentes según el área geográfica que se considere. En los países avanzados, en los que el problema es de superproducción de alimentos, la explotación de la fijación de nitrógeno serviría, si acaso, para disminuir los costos de las cosechas. Sin embargo, en los países en vías de desarrollo o sub-desarrollados la situación económica es muy diferente: existe en ellos un claro déficit en alimentos proteicos y la utilización de abonos nitrogenados eficaces es difícil porque en muchos de ellos no existe una industria química local y la importación de abonos es tan difícil y tan cara como la de alimentos. En esta situación, la explotación de plantas fijadoras de nitrógeno puede ser una necesidad imperiosa, pero teniendo en cuenta, como señala Halliday [143], que el uso de las leguminosas debe llegar a ser un complemento a la utilización de abonos nitrogenados para el cultivo de cereales, pero nunca llegar a sustituirla por completo.

9. Consideraciones finales y perspectivas

La simbiosis entre los rizobios y las leguminosas se ha convertido en el paradigma de las interacciones entre los microorganismos y las plantas, debido sobre todo al enorme esfuerzo investigador que ha concitado, desde las investigaciones agronómicas hasta la biología molecular y se trata de un área de en la que coinciden como en pocas los aspectos de investigación llamada básica y aplicada.

Una de las cuestiones más interesantes que pueden ser abordadas es la relativa al significado de la simbiosis. Suele considerarse como evidente que la simbiosis entre los rizobios y las leguminosas es una relación mutualista en la que ambos elementos obtienen beneficio. En el caso de la leguminosa hospedadora el beneficio es claro: tiene un aporte directo de nitrógeno que le permite vivir en suelos deficientes en formas combinadas de este elemento. Sin embargo, en el caso del elemento bacteriano de la asociación el beneficio es notablemente más dudoso. En efecto, como queda dicho, los rizobios se diferencian a bacteroides para lograr una simbiosis eficaz y ésta es una forma bacteriana que puede ser considerada "a término". Realmente, está sometido a controversia si la diferenciación a bactoide es o no reversible [2,359], pero parece confirmarse que sólo es posible en medios específicos [345,359] y, por ello, resulta

improbable que sea significativa en los ambientes naturales y es más probable que sean destruidos durante la senescencia del nódulo [261], cuando el simbiosoma adquiere su carácter lítico. Por consiguiente, se plantea la aparente paradoja de que en el curso de la evolución se haya mantenido un genotipo (el que determina la capacidad para infectar a las leguminosas) que resulta letal para la bacteria, ya que los bacteroides no contribuyen a las generaciones posteriores. ¿Cuál es, entonces, el beneficio que obtiene la bacteria al establecer la relación simbiótica?. Crecientemente va avanzando la idea de que se trata de un caso de "altruismo" en el que los bacteroides se sacrifican durante la degradación del nódulo, pero bacterias iguales, que permanecen sin diferenciar en el interior del nódulo o en el tubo de infección encuentran un hábitat en el que se aseguran un aporte de nutrientes superior al existente en la rizosfera a la que son liberadas cuando termina la vida del nódulo, asegurando de esta manera la pervivencia de la estirpe en un suelo determinado [176].

En los últimos años ha avanzado considerablemente nuestro conocimiento sobre los aspectos básicos de la simbiosis, pero aun quedan muchas cuestiones por resolver, casi todas relacionadas con el intercambios de señales, es decir, la "conversación inteligente" [256] que mantienen la bacteria y la planta hospedadora. Por citar algunas, las más importantes serían: 1) ¿Cuál es el mecanismo de activación de la proteína NodD que, a su vez, activa la transcripción de los operones *nod*?. 2) ¿Cómo interactúa la proteína Nod modificada con la ARN polimerasa de la bacteria. a fin de lograr dicha activación?. 3) ¿Mediante qué mecanismos el factor Nod específico desencadena tres procesos morfogénicos (curvatura del pelo radical, crecimiento del tubo de infección e inducción de la división celular) aparentemente diferentes?. 4) ¿Son necesarias otras moléculas señal, además de los factores Nod, para culminar el proceso de diferenciación del nódulo?. 5) ¿Es el ácido indololítico una segunda señal para el crecimiento del nódulo radical o, al menos, para los indiferenciados que crecen por aumento de tamaño de sus células y no por división celular?. 6) ¿Interviene esta auxina en el funcionamiento del nódulo radical?, y, en cualquier caso, ¿por qué y para qué se acumula en los tejidos nodulares más que en otras zonas de la raíz?.

La respuesta a estas cuestiones puede también abrir campos de aplicación en agricultura. Por ejemplo, los recientes avances sobre la regulación de los genes *nod* ha abierto la posibilidad de resolver, en parte, el problema de la competitividad. Así, se ha comprobado que en las condiciones de campo la expresión de los genes *nod* en algunos casos es muy limitada. Sin embargo, añadiendo a los inoculantes comerciales el inductor específico (flavona, isoflavona o flavanona) se puede mejorar la eficacia de la nodulación por un incremento de la expresión de dichos genes. Alternativamente, cabe la posibilidad de una manipulación de los promotores *nod* a fin de lograr una respuesta más eficaz a las bajas concentraciones de inductor presentes en la rizosfera. La identificación de los genes estructurales de la nitrogenasa y de otras funciones del nódulo (transporte de carbono, balance energético y reciclado de hidrógeno) también

ha abierto nuevas perspectivas de aplicación. Así, por ejemplo, la transferencia de los genes del sistema Hup a estirpes más infectivas o más competitivas, pero de fenotipo Hup⁻, puede redundar en una mayor eficacia fijadora de estos nuevos sistemas. Si se lograra demostrar que el AIA activa a la ATPasa de la membrana peribacterioidea, el aislamiento de mutantes superproductores de la auxina conduciría a la obtención de estirpes más resistentes a la inhibición por nitratos y, por ser más eficaces en el transporte de metabolitos hacia el simbiosoma, más eficaces en su actividad fijadora. El conocimiento de los genes *nif* y del hecho de que en muchas bacterias fijadoras de nitrógeno se localizan en plásmidos, abre la posibilidad de transferirlos, no sólo a otros microorganismos, sino también a los vegetales, haciéndolos de esta forma capaces, al menos en teoría, de fijar el dinitrógeno por sí mismos. En los comienzos de los años setenta se publicaron muchos trabajos sobre la incorporación y la expresión de genes bacterianos en plantas superiores, aunque luego estos trabajos no han sido continuados. Sin embargo, en la actualidad se baraja la posibilidad de incorporar los genes *nif* a *Agrobacterium tumefaciens* o a *A. rhizogenes*. Estas son dos especies de bacterias patógenas para vegetales superiores que infectan a las plantas y transforman sus células, es decir, transfieren parte de su ADN al núcleo celular, donde se incorporan al ADN nuclear y se expresan. El desarrollo es la aparición de un tumor (agalla en el caso de *A. tumefaciens* o un crecimiento desordenado de las raíces, en el de *A. rhizogenes*). Por consiguiente, cabe la posibilidad de introducir los genes *nif* en *Agrobacterium* y, de esta forma, intentar su introducción en las células de cualquier planta susceptible a la infección por esta bacteria. De hecho, los genes *nif* ya han sido transferidos a *A. tumefaciens* [160] y en ocasiones, la descendencia puede fijar el dinitrógeno; incluso se han aislado estirpes silvestres de *A. tumefaciens* capaces de fijar dinitrógeno [184], pero, desgraciadamente, las gramíneas, principales plantas utilizadas para la producción de alimentos ricos en proteínas son, como todas las monocotiledóneas, resistentes a la infección por *Agrobacterium* y, por ello, la utilización de esta bacteria para transferir los genes *nif* a plantas interesantes desde el punto de vista agrícola es todavía hipotética. Una posibilidad alternativa sería la introducción del microorganismo diazotrofo intacto en las células del vegetal, a fin de intentar establecer un sistema estable capaz de fijar el nitrógeno. En este sentido, hay fundadas esperanzas de introducir cianobacterias fijadoras de dinitrógeno en el citoplasma de células vegetales (o de micorrizas que se pudieran asociar a la planta), a fin de que se convirtieran en orgánulos fijadores de nitrógeno estables.

10. Agradecimientos

El trabajo de los autores ha estado financiado por la Dirección General de Universidades e Investigación del Gobierno de Canarias (Proyecto número 14/310789. expresamos nuestro agradecimiento

11. Bibliografía

- [1] AGUILAR, J.M.M., ASHBY, A.M., RICHARDS, A.J.M., LOAKE, G.J., WATSON, M.D. y SHAW, C.H. (1988), *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 2741-2746.
- [2] ALMON, L. (1933), *Zentralbl. Bakteriell. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt.*, **87**, 289-297.
- [3] APPELBAUM, E.R., THOMPSON, D.V., IDLER, K. y CHARTRAIN, N. (1988), *J. Bacteriol.*, **170**, 12-20.
- [4] APRISON, M.H., MAGEE, W.E. y BURRIS, R.H. (1954), *J. Biol. Chem.*, **208**, 29-39.
- [5] ARMITAGE, J.P., GALLAGHER, A. y JOHNSTON, A.W.B. (1988), *Mol. Microbiol.*, **2**, 743-748.
- [6] ARWAS, R., MCKAY, I.A., ROWNEY, F.R.P., DILWORTH, M.J. y GLENN, A.R. (1985), *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 2059-2066.
- [7] ATKINS, C.A. (1981), *FEBS Lett.*, **125**, 89-93.
- [8] ATKINS, C.A., RAINBIRD, R.M. y PATE, J. (1980), *Z. Pflanzenphysiol.*, **97**, 249-260.
- [9] ATKINS, C.A., RITCHIE, A., ROWE, P.B., MCCAIRNS, E. y SAUER, D. (1982), *Plant Physiol.*, **70**, 55-60.
- [10] ATKINS, C.A., SHELPI, B.J., STORER, P.J. y PATE, J.S. (1984), *Planta*, **162**, 327-333.
- [11] AWONAIKE, K.O., LEA, P.J. y MIFLIN, B.J. (1981), *Plant Sci. Lett.*, **23**, 189-185.
- [12] BAEV, N., ENDRE, G., PETROVICS, G., BANFALVI, Z. y KONDOROSI, A. (1991), *Mol. Gen. Genet.*, **28**, 113-124.
- [13] BAKHIZEN, R. (1988): *The plant cytoskeleton in the Rhizobium-legume symbiosis*. Tesis Doctoral. Universidad de Leiden. The Netherlands. Citado en Hirsch, A.M. (1992) *New Phytol.*, **122**, 211-237.
- [14] BAREA, J.M y AZCON-AGUILAR, C. (1983), *Adv. Agron.*, **36**, 1-54.
- [15] BASSET, B., GOODMAN, R.N. y NOVACKY, A. (1977), *Can. J. Microbiol.*, **23**, 873-883.
- [16] BEDMAR, E.J. (1992): en: *Interacción Planta-Microorganismo: Biología del nitrógeno* (J. González López y C. Lluch Pla, eds.). Rueda. Alcorcón.
- [17] BELLOGÍN, R.A., ESPUNY, M.R., GUTIÉRREZ-NAVARRO, A.M. y PÉREZ-SILVA, J. (1984), *Soil. Biol. Biochem.*, **16**, 23-26.
- [18] BERGERSEN, F.J. Y BRIGGS, M.J. (1958), *J. Gen. Microbiol.*, **19**, 482-490.
- [19] BERGERSEN, F.J. y TURNER, G.L. (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **141**, 507-515.
- [20] BERGERSEN, F.J. y TURNER, G.L. (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **538**, 406-416.
- [21] BERGERSEN, F.J. y TURNER, G.L. (1988), *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 2441-2448.
- [22] BEYNON, J.L., WILLIAMS, M.K. y CANNON, F.C. (1988), *EMBO J.*, **7**, 7-14.
- [23] BISHOP, P.E. (1986), *TIBS*, **11**, 225-227.
- [24] BISHOP, P.E., GUEVARA, J.G., ENGELKE, J.A. y EVANS, H.J. (1976), *Plant Physiol.*, **57**, 542-546.
- [25] BLUMWALD, E., FORTIN, M.G. REA, P.A., VERMA, D.P.S. y POOLE, R.J. (1985), *Plant Physiol.*, **78**, 655-672.
- [26] BOHLOOL, B.B. y SCHMIDT, E.L. (1974), *Science*, **185**, 269-271.
- [27] BOLAND, M.J. y BENNY, A.G. (1977), *Eur. J. Biochem.*, **79**, 355-362.
- [28] BOLAND, M.J., FARNSDEN, K.J.F. y ROBERTSON, J.G. (1980), en: *Nitrogen Fixation II* (Newton, W.E. y Orme-Johnson, W.H., eds.) pp 33-52. University Park Press. Baltimore.
- [29] BOLAND, M.J., FORDYCE, A.M. y GREENWOOD, R.M. (1978), *Aust. J. Plant Physiol.*, **5**, 553-559.
- [30] BOLAND, M.J., HANKS, J.F., REYNOLDS, P.H.S., BLEVINS, D.G., TOLBERT, N.E. y SCHUBERT, K.R. (1982), *Planta*, **155**, 45-51.
- [31] BOLAND, M.J. y SCHUBERT, K.R. (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **213**, 486-491.
- [32] BOLAND, M.J. y SCHUBERT, K.R. (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **220**, 179-187.
- [33] BOLLER, T y KENDE, H. (1979), *Plant Physiol.*, **78**, 665-672.
- [34] BOLTON, E., HIGGISON, B., HARRINGTON, A. y O'GARA, F. (1986), *Arch. Microbiol.*, **144**, 142-146.
- [35] BREWIN, N.J. (1991), *Annu. Rev. Cell Biol.*, **7**, 191-226.
- [36] BREWIN, N.J., RAE, A.L., PEROTTO, S., KNOX, J.P., ROBERTS, K. (1990). en: *Nitrogen fixation: Achievements and objectives* (P.M. Gresshoff, J. Roth, G. Stacey y W.E. Newton, eds.). Chapman and Hall. New York.
- [37] BREWIN, N.J., DOWNIE, J.A. y YOUNG, J.P.W. (1992), en: *Encyclopedia of Microbiology*, vol 3 (J. Lederberg, ed.). Academic Press. San Diego.
- [38] BRILL, W.J. (1980), *Microbiol. Rev.*, **44**, 449-467.
- [39] BROWN, C.M. y DILWORTH, M.J. (1975), *J. Gen. Microbiol.*, **86**, 39-48.

- [41] BURGESS, B.K. (1.985), en: *Molybdenum enzymes* (T.G. Spiro, eds.). John Wiley and Sons. New York.
- [42] BURGESS, B.K. (1.985), en: *Nitrogen Fixation Research Progress* (H.J. Evans, P.J. Bottomley y W.E. Newton, eds.). Martinus Nijhoff Pub. Dordrecht.
- [43] BURN, J., ROSSEN, L y JOHNSTON, A.W.B. (1.987), *Genes Dev.*, **1**, 456-464.
- [44] BURN, J., HAMILTON, W.D., WOOTTON, J.C. y JOHNSTON, A.W.B. (1.989), *Mol. Microbiol.*, **3**, 1567-1577.
- [45] BUTLER, G.W. y BATHURST, N.O. (1.958), *Aust. J. Biol. Sci.*, **11**, 529-537.
- [46] CAETANO-ANOLLES, G., CHRIST-ESTES, D.K. y BAUER, W.D. (1.988), *J. Bacteriol.*, **170**, 3164-3169.
- [47] CAETANO-ANOLLES, G. y GRESSHOFF, P.M. (1.991), *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**, 345-382.
- [48] CALLAHAM, D.A. y TORREY, J.G. (1.981), *Can. J. Bot.*, **59**, 1647-1664.
- [49] CANNON, F.C. y POSTGATE, J.R. (1.976), *Nature (London)*, **260**, 271-272.
- [50] CANNON, F.C., RIEDEL, G.E. y AUSUBEL, F.M. (1.979), *Mol. Gen. Genet.*, **174**, 59-66.
- [51] CARNAHAM, J.E., MORTENSON, K.E., MOWER, H. y CASTLE, J.C. (1.960), *Biochim. Biophys. Acta*, **44**, 520-535.
- [52] CARTER, K.R., RAWLINGS, J., ORME-JOHNSON, W.H., BECKER, R.R. y EVANS, H.J. (1.980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4213-4223.
- [53] CAVALIER-SMITH, T. y LEE, J.J. (1.985), *J. Protozool.*, **32**, 376-379.
- [54] COPELAND, L., VELLA, J. y HONG, A. (1.989), *Phytochemistry*, **28**, 57-61.
- [55] CORZO, J., GUTIÉRREZ-NAVARRO, A.M., LEÓN-BARRIOS, M. y PÉREZ-GALDONA, R. (1.991), en: *Aportaciones a la Biología de la Fijación Biológica del Nitrógeno atmosférico*. (M. Mejías Guijo, A.J. Palomares Díaz y F. Ruiz Berraquero, eds). Pub. Univ. Sevilla. Sevilla.
- [56] CULLIMORE, J.V., LARA, M., LEA, P.J. y MIFLIN, B.J. (1.983), *Planta*, **157**, 245-253.
- [57] CHANDRASEKHARAN, P.T. y SHETHNA, Y.I. (1.976), *Antonie van Leeuwenhoek*, **42**, 471-482.
- [58] CHATT, J. (1.980), en: *Nitrogen Fixation* (W.D.P. Stewart y J.R. Gallon, eds.) Academic Press. London.
- [59] CHISNELL, J.R., PREMAKUMAR, R. y BISHOP, P.E. (1.988), *J. Bacteriol.*, **170**, 27-33.
- [60] CHRISTENSEN, T.M.I.E. y JOCHIMSEN, B.U. (1.983), *Plant Physiol.*, **72**, 56-59.
- [60a] DAKORA, F.D., JOSEPH, C.M. y PHILLIPS, D.A. (1.993), *Plant Physiol.*, **101**, 819-824.
- [61] DART, P.J. (1.977), en: *A Treatise on Dinitrogen Fixation* (R.W.F. Hardy, ed.). Wiley. New York.
- [62] DAVID, M., DAVERAN, M.L., BATUTY, L., DEDIEU, A., DOMERGUE, O., GAHI, J., HERTING, C., BOISTARD, P. y KAHN, D. (1.988), *Cell*, **54**, 671-683.
- [63] DAVIES, D.D. (1.980), en: *The biochemistry of plants: An advanced treatise* (P.K. Stumpf y E.E. Conn, eds.) vol 2. Academic Press. New York.
- [64] DAVIS, E.O. y JOHNSTON, A.W.B. (1.990), *Molec. Microbiol.*, **4**, 933-941.
- [65] DAY, D.A., PRICE, G.D. y UDVARDI, M.K. (1.989), *Aust. J. Plant Physiol.*, **16**, 69-84.
- [66] DAZZO, F.B. y BRILL, W.J. (1.977), *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 132-136.
- [67] DAZZO, F.B. y BRILL, W.J. (1.979), *J. Bacteriol.*, **137**, 1362-1373.
- [68] DAZZO, F.B. y HUBBELL, D.H. (1.975), *Appl. Environm. Microbiol.*, **30**, 1017-1033.
- [69] DEBELLÉ, F., ROSENBERG, C., VASSE, J., MAILLET, F. y MARTINEZ, E. (1.986), *J. Bacteriol.*, **168**, 1075-1086.
- [70] DE BRUIJN, F.J., y DOWNIE, J.A. (1.991), *Curr. Biol.*, **2**, 184-192.
- [71] DÉNARIÉ, J., DEBELLÉ, F. y ROSENBERG, C. (1.992), *Annu. Rev. Microbiol.*, **46**, 497-531.
- [72] DILWORTH, M.J., EADY, R.R. y ELDRIDGE, M. (1.988), *Biochem. J.*, **249**, 745-751.
- [73] DILWORTH, M. y GLENN, A. (1.984), *TIBS*, **9**, 519-523.
- [74] DIXON, R.A. (1.988), en: *The nitrogen and sulfur cycles* (J.A. Cole y S.J. Ferguson, eds.). Cambridge University Press. Cambridge.
- [75] DIXON, R.A., CANNON, F. y KONDOROSI, A. (1.976), *Nature (London)*, **260**, 268-271.
- [76] DIXON, R.A., EADY, R.R., ESPIN, G., HILL, S., IACCARINO, M., KAHN, D. y MERRICK, M. (1.980), *Nature (London)*, **286**, 128-132.
- [77] DIXON, R.A. y POSTGATE, J.R. (1.972), *Nature (London)*, **260**, 268-271.
- [78] DJORDJEVIC, M.A., GABRIEL, D.W. y ROLFE, B.G. (1.987), *Annu. Rev. Phytopathol.*, **25**, 145-168.
- [79] DJORDJEVIC, M.A., REDMOND, J.W., BATLEY, M. y ROLFE, B.G. (1.987), *EMBO J.*, **6**, 1173-1179.
- [80] DJORDJEVIC, M.A., SCHOFIELD, P.R. y ROLFE, B.G. (1.985), *Mol. Gen. Genet.*, **200**, 463-471.
- [81] DOMIGAN, N.M., FARNDEN, K.J.F., ROBERTSON, J.G. y MONK, B.C. (1.988), *Arch. Biochem. Biophys*, **264**, 564-573.
- [82] DOWLING, D.N. y BROUGHTON, W.J. (1.986), *Annu. Rev. Microbiol.*, **40**, 131-157.
- [83] DOWNIE, J.A. (1.989), *Mol. Microbiol.*, **3**, 1649-1651.
- [84] DOWNIE, J.A., KNIGHT, C.D., JOHNSTON, A.W.B. y ROSSEN, L. (1.985), *Mol. Gen. Genet.*, **198**, 255-262.

- [85] DUKE, S.H. y HENSON, C.A. (1.985), en: *Nitrogen fixation and CO₂ metabolism* (P.W. Ludden y J.E. Burris, eds.). Elsevier. New York.
- [86] DUKE, S.H. y HAM, G.E. (1.976), *Plant Cell Physiol.*, **17**, 1037-1044.
- [87] DUNCAN, M.J. y FRAENKEL, D.G. (1.979), *J. Bacteriol.*, **137**, 415-419.
- [88] DUNHAM, W.R., HAGEN, W.R., BRAAKSMA, A., HAAKER, H., GHELLER, S., NEWTON, W.E. y SMITH, B. (1.985), en: *Nitrogen Fixation Research Progress* (H.J. Evans, P.J. Botomley y W.E. Newton, eds.). Martinus Nijhoff Pub. Dordrecht.
- [89] EADY, R.R., ISSACK, R., KENNEDY, C., POSTGATE, J.R. y RATCLIFFE, H. (1.978), *J. Gen. Microbiol.*, **104**, 277-285.
- [90] EADY, R.R. (1.989), *Polyedron*, **8**, 1615-1700.
- [91] EADY, R.F. (1992), en: *The Prokaryotes*. 2nd Edition (A. Balows *et al*, eds). Springer Verlag. New York.
- [92] EARL, C.D., RONSON, C.W. y AUSUBEL, F.M. (1.987), *J. Bacteriol.*, **169**, 1127-1136.
- [93] EBELING, S., NOTI, J.D. y HENNECKE, H. (1.988), *J. Bacteriol.*, **170**, 1999-2001.
- [94] EGELHOFF, T.T., FISHER, R.F., JACOBS, T.W., MULLIGAN, J.T. y LONG, S.R. (1.985), *DNA*, **4**, 241-248.
- [95] EGELHOFF, T.T. y LONG, S.R. (1.985), *J. Bacteriol.*, **164**, 591-599.
- [96] EGLI, M.A., GRIFFITH, S.M., MILLER, S.S., ANDERSON, M.P. y VANCE, C.P. (1.989), *Plant Physiol.*, **91**, 898-904.
- [97] EMERICH, D.W. (1.985), en: *Nitrogen Fixation and CO₂ metabolism* (Ludden, P.W. y Burris, J.E., eds.). Elsevier Sci. Pub. Co., New York.
- [98] EMERICH, D.W., ANTHON, G.E., HAYES, R.R., KARR, D.B., LIANG, R. PRESTON, G.G., SMITH, M.T. y WATERS, J.K. (1.988), en: *Nitrogen fixation: hundred years after* (H. Bothe, F.J. de Bruijn y W.E. Newton, eds). Gustav Fischer. Stuttgart.
- [99] EVANS, H.J. y DOWNIE, J.A. (1.986), *Gene*, **43**, 95-101.
- [100] EVANS, H.J., RUSSELL, S.A., HANUS, F.J., PAPEN, H., SAYAVEDRA SOTO, L., ZUBER, M. y BOURSIER, P. (1.988), en: *Nitrogen fixation: hundred years after* (H. Bothe, F.J. de Bruijn y W.E. Newton, eds). Gustav Fischer. Stuttgart.
- [101] FARIA, S.M. DE, FRANCO, A.A., DE JESUS, R.M., MENANDRO, M.S., BAITELLO, J.B., MUCCI, E.S.F. y DÖBEREINER, J. (1.984), *New Phytol.*, **98**, 317-328.
- [102] FARIA, S.M. DE, MCINROY, S.G. y SPRENT, J.I. (1.987), *Can J. Bot.*, **65**, 553-558.
- [103] FARIA, S.M. DE, SUTHERLAND, J.M. y SPRENT, J.I. (1.986), *Plant Sci.*, **45**, 143-147.
- [104] FERNHAM, M.W., GRIFFITH, S.M., MILLER, S.S. y VANCE, C.P. (1.990), *Plant Physiol.*, **94**, 1634-1640.
- [105] FERNHAM, M.W., MILLER, S.S., GRIFFITH, S.M. y VANCE, C.P. (1.990), *Plant Physiol.*, **93**, 603-610.
- [106] FINAN, T.M., HIRSCH, A.M., LEIGH, J.A., JOHANSEN, E., KULDAU, G.A., DEEGAN, S., WALKER, G.C. y SINGER, E.R. (1.985), *Cell*, **40**, 869-877.
- [107] FINAN, T.M., WOOD, J.M. y JORDAN, D.C. (1.983), *J. Bacteriol.*, **154**, 1403-1413.
- [108] FIRMIN, J.L., WILSON, K.E., ROSSEN, L., MESSAGE, B. LECOEUR, L., MAILLE, M. y TEPFER, D. (1.986), *Nature*, **324**, 90-92.
- [109] FISHER, R.F. y LONG, S.R. (1.992), *Nature*, **357**, 655-660.
- [110] FISHER, R.F., TU, J.K. y LONG, S.R. (1.985), *Appl. Environ., Microbiol.*, **49**, 1432-1435.
- [111] FITZMAURICE, A.M. y O'GARA, F. (1.988), en: *Nitrogen fixation: hundred years after* (H. Bothe, F.J. de Bruijn y W.E. Newton, eds). Gustav Fischer. Stuttgart.
- [112] FOTTRELL, P.F. y MOONEY, P. (1.969), *J. Gen. Microbiol.*, **59**, 211-214.
- [113] FOWDEN, L. y WEBB, J.A. (1.955), *Biochem. J.*, **59**, 228-234.
- [114] FOWDEN, L. y WEBB, J.A. (1.958), *Ann. Bot.*, **22**, 73-93.
- [115] FUJIHARA, S. y YAMAGUCHI, M. (1.978), *Plant Physiol.*, **62**, 134-138.
- [116] FUJIHARA, S. y YAMAGUCHI, M. (1.978), *Phytochemistry.*, **17**, 1239-1243.
- [117] FUJIHARA, S. y YAMAGUCHI, M. (1.980), *Plant Physiol.*, **66**, 139-141.
- [118] GADNER, I.C. y LEAF, G. (1.960), *Plnt Physiol.*, **35**, 948-950.
- [119] GALLON, J.R. y CHAPLIN, A.E. (1.987), *An introduction to nitrogen fixation*. Cassel Educational Ld. London.
- [120] GANTT, J.S., LARSON, R.J., FARNHAM, M.W., PATHIRANA, S.M., MILLER, S.S. y VANCE, C.P. (1992), *Plant Physiol.*, **98**, 868-878.
- [121] GARBERS, C., MENKBACH, R. MELLOR, R.B. y WERNER, D. (1.988). *J. Plant. Physiol.*, **132**, 442-445.
- [122] GARDIOL, A., ARIAS, A., CERVEŇASKY, C. y MARTÍNEZ-DRETS, G. (1.982), *J. Bacteriol.*, **151**, 1621-1623.
- [123] GAWORZEWSKA, E.T. y CARLILE, M.J. (1.982), *J. gen. Microbiol.*, **128**, 1179-1188.

- [124] GEBHARDT, C., TURNER, G.L., GIBSON, A.H., DREYFUS, B.L. y BERGERSEN, F.J. (1984), *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 843-848.
- [125] GILLUM, W.O., MORTENSON, L.E., CHEN, J.S. y HOLM, R.H. (1977), *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 584-595.
- [126] GLENN, A.R. y BREWIN, N.J. (1981), *J. Gen. Microbiol.*, **126**, 237-241.
- [127] GLENN, A.R. y DILWORTH, M.J. (1981), *Arch. Microbiol.*, **129**, 233-239.
- [128] GLENN, A.R. y DILWORTH, M.J. (1984), *J. Gen. Microbiol.*, **103**, 1961-1968.
- [129] GOBER, J.W., y KASHKET, E.R. (1983), *J. Bacteriol.*, **153**, 1196-1201.
- [130] GOETHALS, K., GAO, M., TOMEKPE, K., VAN MONTAGU, M. y HOLSTERS, M. (1989), *Mol. Gen. Genet.*, **219**, 289-298.
- [131] GRAHAM, P.H. y PARKER, C.A. (1964), *Plant Soil.*, **20**, 383-394.
- [132] GRAHAM, T.L. (1991), *Plant Physiol.*, **95**, 594-603.
- [133] GRIFFITH, S.M. y VANCE, C.P. (1989), *Plant Physiol.*, **90**, 1622-1629.
- [134] GROAT, R.G. y SCHRADER, L.E. (1982), *Plant Physiol.*, **70**, 1759-1761.
- [135] GROAT, R.G. y VANCE, C.P. (1981), *Plant Physiol.*, **67**, 1198-1203.
- [136] GUBLER, M. y HENNECKE, H. (1986), *FEBS Lett.*, **200**, 186-192.
- [137] GULASH, M., AMES, P., LAROSILIERE, R.C. y BERGMAN, K. (1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 149-152.
- [138] GUTIERREZ NAVARRO, A.M., LEON BARRIOS, M.A., PEREZ GALDONA, R. y CORZO, J. (1992), *Soil Biol. Biochem.*, **24**, 917-918.
- [139] GUY, R.D., VANLERBERGHE, G.C. y TURPIN, D.H. (1989), *Plant Physiol.*, **89**, 1150-1157.
- [140] GYÖRGYPAL, Z., IYER, N. y KONDOROSI, A. (1988), *Mol. Gen. Genet.*, **212**, 85-92.
- [141] GYÖRGYPAL, Z., KONDOROSI, E. y KONDOROSI, A. (1991), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **4**, 356-364.
- [142] HAGER, A., DEBUS, G., EDEL, H.G., STRANSKY, H. y SERRANO, R. (1991), *Planta*, **185**, 527-537.
- [143] HALLIDAY, J. (1985), en: *Nitrogen Fixation Research Progress* (Evans, H.J., Bottomley, P.J. y Newton, W.E., eds.), Nijhoff Pub. Dordrecht.
- [144] HANKS, J.F., TOLBERT, N.E. y SCHUBERT, K.R. (1981), *Plant Physiol.*, **68**, 65-69.
- [145] HANUS, F.J., MAIER, R.J. y EVANS, H.J. (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1788-1792.
- [146] HARBONE, J.B. (1989), en *Secondary Plant Products* (E.A. Bell y B.V. Charlwood, eds.), Springer, Berlin.
- [147] HARDY, R.W.F. (1980), en: *Nitrogen Fixation*, vol. I (Newton, W.E. y Orme-Johnson, W.H., eds.), University Park Press, Baltimore.
- [148] HARTWIG, U.A., JOSEPH, C.M. y PHILLIPS, D.A. (1991), *Plant Physiol.*, **95**, 797-803.
- [149] HARTWIG, U.A., MAXWELL, C.A., JOSEPH, C.M. y PHILLIPS, D.A. (1989), *Plant Physiol.*, **91**, 1138-1142.
- [150] HARTWIG, U.A., MAXWELL, C.A., JOSEPH, C.M. y PHILLIPS, D.A. (1990), *Plant Physiol.*, **92**, 116-122.
- [151] HAYNES, A.G., HAYNES, W. y WHITE, G. (1979), en: *Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests* (Gordon, J.C., ed.) Oregon State University Press, Corvallis.
- [152] HENNECKE, H., FISCHER, H.M., GUBLER, M., THÖNY, B. y ANTHAMATTEN, D. (1988), en: *Nitrogen fixation: hundred years after* (H. Bothe, F.J. de Bruijn y W.E. Newton, eds.), Gustav Fischer, Stuttgart.
- [153] HIGGINS, C.F., HILES, I.D., SALMOND, G.P.C., GILL, D.R. y DOWNIE, J.A. (1986), *Nature*, **323**, 448-450.
- [154] HILLS, S. y KAVANAGH, E.P. (1980), *J. Bacteriol.*, **141**, 470-475.
- [155] HILLS, S., KENNEDY, C., KAVANAGH, E., GOLDBERG, R. y HANAU, R. (1981), *Nature (London)*, **290**, 424-426.
- [156] HIRSCH, A.M. (1992), *New Phytol.*, **122**, 211-237.
- [157] HIRSCHMAN, J., WONG, P.K., SEI, K., KEENER, J. y KUSTU, S. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7525-7529.
- [158] HONMA, M., ASOMANING, M. y AUSUBEL, F.M. (1990), *J. Bacteriol.*, **172**, 901-911.
- [159] HONMA, M. y AUSUBEL, F.M. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8558-8562.
- [160] HOOYKAAS, P.J.J., DEN DULK-RAS, H., REGENSBURG-TUINK, A.J.G., VAN BRUSSEL, A.A.N. y SCHILPEROORT, R.A. (1985), *Plasmid*, **14**, 47-52.
- [161] HORISBERGER, M. y TACCHINI-VOLANTHEN, M. (1983), *Histochemistry*, **77**, 37-50.
- [162] HORVATH, B., BACHEM, C.W.B., SCHELL, J. y KONDOROSI, A. (1987), *EMBO J.*, **6**, 841-848.
- [163] HORVATH, B., KONDOROSI, E., JOHN, M., SCHMIDT, J. y TOROK, I. (1986), *Cell*, **46**, 335-343.
- [164] HOSTAK, M.S., HENSON, C.A., DUKE, S.H. y VANDENBOSCH, K.A. (1987), *Can. J. Bot.*, **65**, 1108-1115.

- [164a] HOTTER, G.C. y SCOTT, D.B. (1.991), *J. Bacteriol.*, **173**, 851-859.
- [165] HOWITT, S.M. y GRESSHOFF, P.M. (1.985), *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 1433-1440.
- [166] HOWITT, S.M., UDVARDI, M.K., DAY, D.A. y GRESSHOFF, P.M. (1.986), *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 257-261.
- [167] HUBER, T.A. y STREETER, J.G. (1.984), *Plant Physiol.*, **74**, 605-610.
- [168] HUMBECK, C. y WERNER, D. (1.988), en: *Nitrogen fixation: hundred years after* (H. Bothe, F.J. de Bruijn y W.E. Newton, eds). Gustav Fischer. Stuttgart.
- [169] HUNGRIA, M., JOSEPH, C.M. y PHILLIPS, D.A. (1.991), *Plant Physiol.*, **97**, 751-758.
- [170] HUNGRIA, M., JOSEPH, C.M. y PHILLIPS, D.A. (1.991), *Plant Physiol.*, **97**, 759-764.
- [171] HUNTER, J.W. (1.989), *Physiol. Plant.*, **76**, 31-36.
- [172] IMPERIAL, J., UGALDE, R.A., SHAH, V.K. y BRILL, W.J. (1.984), *J. Bacteriol.*, **158**, 187-194.
- [173] IRIGOYEN, J.J., SÁNCHEZ-DÍAZ, M. y EMERICH, D.W. (1.990), *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2587-2591.
- [174] JACKSON, F.A. y DAWES, E.A. (1.976), *J. Gen. Microbiol.*, **97**, 303-312.
- [175] JACOBS, T.W., EGELHOFF, T.T. y LONG, S.R. (1.985), *J. Bacteriol.*, **162**, 469-476.
- [176] JIMENEZ, J. y CASADESUS, J. (1.989), *J. Heredity*, **80**, 335-337.
- [177] JIN, H.N., GLENN, A.R. y DILWORTH, M.J. (1.988), *Arch. Microbiol.*, **149**, 308-311.
- [178] JOHN, M., SCHMIDT, J., WEINEKE, U., KONDOROSI, E., KONDOROSI, A. y SCHELL, J. (1.985), *Eur. Mol. Biol. Org. J.*, **4**, 2425-2430.
- [179] JORDAN, D.C. (1.982), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **32**, 136-139.
- [180] KAHN, M.L. (1.993), VI Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno. Santa Cruz de Tenerife.
- [181] KAHN, M.L., KRAUS, J. y SOMERVILLE, J.E. (1.985), en: *Nitrogen Fixation Research Progress* (H.J. Evans, P.J. Botomley y W.E. Newton, eds.). Martinus Nijhoff Pub. Dordrecht.
- [182] KANESHIRO, T. y KWOLEK, W.F. (1.985), *Plant Sci.*, **42**, 141-146.
- [183] KANNENBERG, E.L. y BREWIN, N.J. (1.989), *J. Bacteriol.*, **171**, 4543-4548.
- [184] KANVINDE, L., y SASTRY, G.R.K. (1.990), *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2087-2092.
- [185] KAPE, R., PARNISKE, M. y WERNER, D. (1.991), *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 316-319.
- [186] KARR, D.B., WATERS, J.K., y EMERICH, D.W. (1.984), *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1339-1344.
- [187] KARR, D.B., WATERS, J.K., SUZUKI, F. y EMERICH, D.W. (1.984), *Plant Physiol.*, **75**, 1158-1162.
- [188] KATO, G., MARUYAMA, Y. y MARUYAMA, M. (1.979), *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1085-1092.
- [189] KELLER, F., SCHELLENBERG, M. y WIEMKEN, A. (1.982), *Arch. Microbiol.*, **131**, 298-301.
- [190] KENNEDY, I.R. (1.966), *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 285-294.
- [191] KEYSER, H.H. y MUNNS, D.N. (1.979), *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, **43**, 519-523.
- [192] KIJNE, J.W. (1.992), en: *Biological Nitrogen Fixation* (G. Stacey, R.H. Burris y H.J. Evans, eds.) Chapman and Hall. New York.
- [193] KIJNE, J.W., SMIT, G., CANTER CREMERS, H.C.J., SPAINK, H.P., DÍAZ, C.L., SWART, S. y LUGTENBERG, B.J.J. (1.991), *J. Exp. Bot.*, **42** (suppl.), 65.
- [194] KITTELL, B.L., HELINSKI, D.R. y DITTA, G.S. (1.989), *J. Bacteriol.*, **171**, 5458-5466.
- [195] KLIPP, W., REILÄNDER, H., SCHLÜTER, A., KREY, R. y PÜHLER, A. (1.989), *Mol. Gen. Genet.*, **216**, 293-302.
- [195a] KONDOROSI, E., BANFALVI, Z. y KONDOROSI, A. (1.984), *Mol. Gen. Genet.*, **193**, 445-452.
- [196] KONDOROSI, E., GYURIS, J., SCHMIDT, J., JOHN, M., DUDA, E., HOFFMANN, B., SCHELL, J. y KONDOROSI, A. (1.989), *EMBO J.*, **8**, 1331-1340.
- [197] KOSSLAK, R.M., BOOKLAND, R., BARKEI, J., PAAREN, H.E. y APPELBAUM, E.R. (1.987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7428-7432.
- [198] KOSSLAK, R.M., JOSHI, R.S., BOWEN, B.A., PAAREN, H.E. y APPELBAUM, E.R. (1.990), *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1333-1341.
- [199] KOUCHI, H. y FUKAI, K. (1.988), en: *Nitrogen fixation: hundred years after* (H. Bothe, F.J. de Bruijn y W.E. Newton, eds). Gustav Fischer. Stuttgart.
- [200] KOUCHI, H., FUKAI, K., KATAGIRI, H., MINAMISAWA, K. y TAJIMA, S. (1.988), *Plant.*, **73**, 327-334.
- [201] LASKOWSKI, M. y KATO, I. (1.980), *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 593-626.
- [202] LANCE, C. y RUSTIN, P. (1.984), *Physiol. Veg.*, **22**, 625-641.
- [203] LARHER, F., GOAS, G., LERUDULIER, D., GERARD, J. y HAMELIN, J. (1.983), *Plant Sci. Lett.*, **29**, 315-326.
- [204] LEAF, G., GADNER, I.C. y BOND, G. (1.959), *Biochem. J.*, **72**, 662-667.
- [205] LEIGH, J.A., REED, J.W., HANKS, J.F., HIRSCH, A.M. y WALKER, G.C. (1.987), *Cell*, **51**, 579-587.
- [206] LEON-BARRIOS, M.A., DAKORA, F.D., JOSEPH, C.M. y PHILLIPS, D.A. (1.993), *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 636-639.
- [207] LEÓN BARRIOS, M., CORZO, J., PÉREZ-GALDONA, R., TRUJILLO, J. y GUTIÉRREZ-NAVARRO,

- A.M. (1.992) *Microbios*, **69**, 97-104.
- [208] LEÓN BARRIOS, M., GUTIÉRREZ-NAVARRO, A.M., PÉREZ-GALDONA, R. y CORZO, J. (1.991). *Soil Biol. Biochem.*, **23**, 487-489.
- [209] LEÓN BARRIOS, M., GUTIÉRREZ-NAVARRO, A.M., PÉREZ-GALDONA, R. DÍAZ-SIVERIO, J., TRUJILLO, J. y CORZO, J. (1.992), *J. Appl. Bacteriol.*, **72**, 91-96.
- [210] LEPO, J.E., HANUS, F.J. y EVANS, H.J. (1.980), *J. Bacteriol.*, **141**, 664-670.
- [211] LEROUGE, P., ROCHE, P., FAUCHER, C., MAILLET, F., TRUCHET, G., PROMÉ, J.C. y DENARIE, J. (1.990), *Nature*, **344**, 781-784.
- [212] LIBBENGA, K.R. y HARKES, P.N.N. (1.973), *Planta*, **114**, 17-28.
- [213] LIGERO, F. y LLUCH PLA, C. (1.992), en: *Interacción Planta-Microorganismo: Biología del nitrógeno* (J. González López y C. Lluch Pla, eds.). Rueda. Alcorcón.
- [214] LONG, S.R. (1.989), *Annu. Rev. genet.*, **23**, 483-506.
- [215] LONG, S.R. (1.989), *Cell*, **56**, 203-214.
- [216] LOWE, D.J., THORNELEY, R.N.F. y POSTGATE, J.R. (1.984), en: *Advances in nitrogen fixation research* (C. Veeger y W.E. Newton, eds.). Martinus Nijhoff Pub. The Hague.
- [217] LUNDEGARDH, H. y STENLID, G. (1.944), *Ark. Bot.*, **31A**, 1-27.
- [218] LLOYD, C.W., PEARCE, K.J., RAWLINS, D.J., RIDGE, R.W. y SHAW, P.J. (1987), *Cell Mot. Cytoskeleton.*, **8**, 27-36.
- [219] MAGASANIK, B. (1.982), *Annu. Rev. Genet.*, **16**, 135-168.
- [220] MAIER, R.J. y BRILL, W.J. (1978), *J. Bacteriol.*, **133**, 1295-1299.
- [221] MARTÍN, R., FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. y GOLVANO, M.P. (1.993), VI Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno. Santa Cruz de Tenerife.
- [222] MARTÍNEZ DE DRETS, G., ARIAS, A. y ROVIRA DE CUTINELLA, M. (1.974), *Can. J. Microbiol.*, **20**, 605-609.
- [223] MAXWELL, C.A. y PHILLIPS, D.A. (1.990), *Plant Physiol.*, **93**, 1552-1558.
- [224] MAZUR, B.J., RICE, D. y HASELKORN, R. (1.980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 186-190.
- [225] MCCLURE, P.R., COKER, G.T. y SCHUBERT, K.R. (1.983), *Plant Physiol.*, **71**, 411-416.
- [226] MCDERMOTT, T.R., GRIFFITH, S.M., VANCE, C.P. y GRAHAM, P.H. (1.989), *FEMS Microbiol. Rev.*, **63**, 327-340.
- [227] MCKAY, I.A., GLENN, A.R. y DILWORTH, M.J. (1.985), *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 2067-2073.
- [228] MCKAY, I.A., GLENN, A.R. y DILWORTH, M.J. (1.988), *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 1433-1440.
- [229] MCPARLAND, R.H., GUEVARA, J.G., BECKER, R.R. y EVANS, H.J. (1.976), *Biochem. J.*, **153**, 597-606.
- [230] MEEKS, J.C., WOLK, C.P., SCHILLING, N., SHAFFER, P.W., AVISSAR, Y. y CHIEN, W.S. (1.978).
- [231] MELZER, E. y O'LEARY, M.H. (1.987), *Plant Physiol.*, **84**, 58-60.
- [232] MELLOR, R.B. (1.988), *J. Plant Physiol.*, **133**, 173-177.
- [233] MELLOR, R.B. (1.989), *J. Exp. Bot.*, **40**, 831-839.
- [234] MELLOR, R.B., CHRISTENSEN, T.M.I.E., BASSARAB, S. y WERNER, D. (1.985), *Zets. Naturf.*, **40**, 73-79.
- [235] MELLOR, R.B., MORSCHER, E. y WERNER, D. (1.984), *Z. Naturforsch.*, **39**, 123-125.
- [236] MELLOR, R.B. y WERNER, D. (1.986), *Endocyt. Cell Res.*, **3**, 317-336.
- [237] MELLOR, R.B. y WERNER, D. (1.987), *Symbiosis*, **3**, 75-100.
- [238] MERRICK, M. y STEWART, W.D.P. (1.985), *Gene*, **35**, 297-303.
- [239] MIETTINEN, J.K. y VIRTANEN, A.I. (1.952), *Physiol. Plant.*, **5**, 540-557.
- [240] MISHUSTIN, E.N. y SHIL'NIKOVA, V.K. (1971), *Biological fixation of atmospheric nitrogen*. MacMillan Press. London.
- [241] MITTENBÜHLER, K. y HOLZER, H. (1.988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 8537-8542.
- [242] MORELL, M. y COPELAND, L. (1.988), *Plant Physiol.*, **78**, 149-154.
- [243] MORTENSON, L.E., MORRIS, J.A. y YENG, D.Y. (1.967), *Biochim. Biophys. Acta*, **141**, 516-522.
- [244] MORTENSON, L.E. y THORNELEY, R.N.F. (1.979), *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 387-418.
- [245] MOTHES, K. (1.961), *Can. J. Bot.*, **39**, 1785-1807.
- [246] MOUSTAFA, E. y LEONG, C.K. (1.975), *Biochim. Biophys. Acta*, **391**, 9-14.
- [247] MULLIGAN, M.E., BUIKEMA, W.J. y HASELKORN, R. (1.988), *J. Bacteriol.*, **170**, 4406-4410.
- [248] MUNNS, D.N. (1.978), en: *Mineral nutrition of legumes in the soils of the tropics and subtropics* (C.S. Andrews y E.J. Kamprath, eds.). C.S.I.R.O. Melbourne.
- [249] NAPOLI, C. y ALBERSHEIM, P. (1.980), *J. Bacteriol.*, **141**, 1454-1456.
- [250] NEWCOMB, W. (1.981), en: *Biology of Rhizobiaceae*, suppl 13, *Int. Rev. Cytol.*, (K.L. Giles y A.G. Atherly, eds.). Academic Press. New York.
- [251] NEWCOMB, W., SIPPEL, D. y PETERSON, R.L. (1.979), *Can. J. Bot.*, **57**, 2603-2616.

- [252] NUTI, M.P., LEPIDI, A.A., PRAKASH, R. K., SCHILPEROORT, R.A. y CANNON, F.C. (1979), *Nature* (London), **282**, 533-535.
- [253] O'GARA, F., BIRKENHEAD, K., NOONAN, B. y MANIAN, S.S. (1988), *J. Plant Physiol.*, **132**, 439-441.
- [254] O'HARA, G.W., RILEY, I.T., GLENN, A.R. y DILWORTH, M.J. (1985), *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 757-764.
- [255] OHYAMA, T. y KUMAZAWA, K. (1980), *Soil Sci. Plant Nutr.*, **26**, 205-213.
- [256] OLIVARES, J. (1993), VI Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno. Santa Cruz de Tenerife.
- [257] OLIVARES, J. y TORO, N. (1992), en: *Interacción Planta-Microorganismo: Biología del nitrógeno* (J. González López y C. Lluch Pla, eds.). Rueda. Alcorcón.
- [258] ORME-JOHNSON, W.H. y DAVIS, L.C. (1977), en: *Iron Sulfur Proteins* (W. Lovenberg, ed), **3**, 15-60. Academic Press. New York.
- [259] OU YANG, L.J., UDVARDI, M.K. y DAY, D.A. (1990), *Planta*, **182**, 437-444.
- [260] OU YANG, L.J., J. WHELAN, J., WEAVER, C.D., ROBERTS, D.M. y DAY, D.A. (1991), *FEBS Lett.*, **282**, 148-151.
- [261] PAAU, A.S., BLOCH, C.B. y BRILL, W.J. (1980), *J. Bacteriol.*, **143**, 1480-1490.
- [262] PALOMARES, A.J. y CORONADO, C. (1992), en: *Interacción Planta-Microorganismo: Biología del nitrógeno* (J. González López y C. Lluch Pla, eds.). Rueda. Alcorcón.
- [263] PARGENT, W. y KLEINER, D. (1985), *FEMS Microbiol. Lett.*, **30**, 257-259.
- [264] PARKE, D., RIVELLI, M. y ORNSTON, L.N. (1985), *J. Bacteriol.*, **123**, 417-422.
- [265] PATE, J.S. y ATKINS, C.A. (1983), en: *Nitrogen fixation* (W.J. Broughton, ed.), vol 3. Oxford University Press. Oxford.
- [266] PATE, J.S., ATKINS, C.A., HAMEL, K., MC NEIL, D.L. y LAYZELL, D.B. (1979), *Plant Physiol.*, **63**, 1082-1088.
- [267] PAUL, E.A. y CLARK, F.E. (1989), *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. San Diego.
- [268] PAYNE, P.I. (1983), en: *Seed proteins* (Daussant, J., Mossé, J. y Vaughan, J. eds). Academic Press. London.
- [269] PEREZ GALDONA, R., CORZO, J., LEON BARRIOS, M.A. y GUTIERREZ NAVARRO, A.M. (1989), *Soil Biol. Biochem.*, **21**, 573-579.
- [270] PEREZ GALDONA, R., CORZO, J., LEON BARRIOS, M.A. y GUTIERREZ NAVARRO, A.M. (1992), *Biochemie*, **74**, 539-544.
- [271] PETERS, N.K., FROST, J.W. y LONG, S.R. (1986), *Science*, **233**, 977-980.
- [272] PETERS, N.K. y LONG, S.R. (1988), *Plant Physiol.*, **88**, 396-400.
- [273] PETERS, N.K. y VERMA, D.P.S. (1990), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **3**, 4-8.
- [274] PHILIP P. DE, BATUT, J. y BOISTARD, P. (1990), *J. Bacteriol.*, **172**, 4255-4262.
- [275] PHILLIPS, D.A. (1991), *Rec. Adv. Phytochem.*, **26**, 1-33.
- [276] PHILLIPS, D.A. (1992), *Adv. Phytochem.*, **26**, 201-231.
- [277] PHILLIPS, D.A., SANDE, E. y JOSEPH, C.M. (1993). VI Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno. Santa Cruz de Tenerife.
- [278] POSTGATE, J.R. y KRISHNAPILLAI, V. (1977), *J. Gen. Microbiol.*, **98**, 379-385.
- [279] PRESTON, G.G., ZEIHNER, C., WALL, J.D. y EMERICH, D.W. (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 165-170.
- [280] PRICE, G.D., MOHAPATRA, S.S. y GRESSHOFF, P.M. (1984), *Bot. Gaz.*, **145**, 444-451.
- [281] PRINSEN, E., CHAUVAUX, N., SCHMIDT, J. JOHN, M., WIENEKE, U., DE GREEF, J., SCHELL, J. y VAN ONCKELEN, H. (1991), *FEBS Lett.*, **282**, 53-55.
- [282] PÜHLER, A., ARNOLD, W., BUENDÍA-CLAVERÍA, A., KAPP, D., KELLER, M., NIEHAUS, K., QUANT, J., ROXLAU, A. y WENG, W.M. (1991), en: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, vol 1. (H. Hennecke y D.P.S. Verma, eds.). Kluwer Academic Pub. Dordrecht.
- [282a] PUVANESARAJAH, V., SCHELL, F.M., GERHOLD, D. y STACEY, G. (1987), *J. Bacteriol.*, **169**, 137-141.
- [283] RAE, A.L. y BREWIN, N.J. (1991), *J. Exp. Bot.*, **42** (suppl.), 37.
- [284] RAYLE, D.L. (1973), *Planta*, **114**, 63-73.
- [285] RAYLE, D.L. y CLELAND, R.E. (1977), *Cur. Top. Dev. Biol.*, **11**, 187-214.
- [286] RAYLE, D.L. y CLELAND, R.E. (1992), *Plant. Physiol.*, **99**, 1271-1274.
- [287] REDMOND, J.W., BATLEY, M., DJORDJEVIC, M.A., INNES, R.W., KUEMPLE, P.L. y ROLFE, B.G. (1986), *Nature*, **323**, 632-635.
- [288] REIBACH, P.H. y STREETER, J.G. (1983), *Plant Physiol.*, **72**, 634-640.
- [289] REINBOTHE, H. y MOTHES, K. (1962), *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **13**, 129-150.
- [290] REYNOLDS, P.H.S., BLEVINS, D.G., BOLAND, M.J., SCHUBERT, K.R. y RANDALL, D.D. (1982), *Physiol. Plant.*, **55**, 255-260.

- [291] REYNOLDS, P.H.S., BOLAND, M.J., BLEVINS, D.G., RANDALL, D.D. y SCHUBERT, K.R. (1.982), *TIBS*, **7**, 366-368.
- [292] REYNOLDS, P.H.S., BOLAND, M.J., BLEVINS, D.G., SCHUBERT, K.R. y RANDALL, D.D. (1.982), *Plant Physiol.*, **69**, 1334-1338.
- [293] REYNOLDS, P.H.S. y FARNDEN, K.J.F. (1.979), *Phytochemistry*, **18**, 1625-1630.
- [294] ROBERTS, G.P. y BRILL, W.J. (1.980), *J. Bacteriol.*, **144**, 210-216.
- [295] ROBERTS, G.P. y BRILL, W.J. (1.981), *Annu. Rev. Microbiol.*, **35**, 207-235.
- [296] ROBERTS, G.P., MAC NEIL, T., MAC NEIL, D. BRILL, W.J. (1.978), *J. Bacteriol.*, **136**, 267-279.
- [298] ROBERTSON, J.G., FARNDEN, K.J.F., WARBURTON, M. y BANKS, J.M. (1.975), *Aust. J. Plant Physiol.*, **2**, 265-272.
- [299] ROBERTSON, J.G., WARBURTON, M.P. y FARNDEN, K.J.F. (1.975), *FEBS Lett.*, **55**, 33-37.
- [300] ROBERTSON, J.G., WARBURTON, M.P., LYTTLETON, P., FORDYCE, A.M. y BULLIVANT, S. (1.978), *J. Cel. Sci.*, **30**, 151-174.
- [301] ROCHE, P., DEBELLE, F., MAILLET, F., LEROUGE, P., FAUCHER, C., TRUCHET, G., DENARIE, J. y PROME, J.C. (1.991), *Cell*, **67**, 1-20.
- [302] ROLFE, B.G. (1.988), *Biofactors*, **1**, 3-10.
- [303] ROLFE, B.G. y GRESSHOOF, P.M. (1.988), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **39**, 297-319.
- [304] RONSON, C.W., LITTLETON, P. y ROBERTSON, J.G. (1.981), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 4284-4288.
- [305] ROSSEN, L., JOHNSTON, A.W.B. y DOWNIE, J.A. (1.984), *Nucleic Acids Res.*, **12**, 9497-9508.
- [306] ROSTAS, K., KONDOROSI, A., HORVATH, B., SIMONCSITS, A. y KONDOROSI, A. (1.986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1757-1761.
- [307] RUSHING, B., YELTON, M.M. y LONG, S.R. (1.990), *Nucleic Acids Res.*, **19**, 921-927.
- [308] RUVKUN, G.B. y AUSUBEL, F.M. (1.980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 191-195.
- [309] RYAN, E. y FOTTRELL, P.F. (1.974), *Phytochemistry*, **13**, 2647-2652.
- [310] SADOWSKY, M.J., CREGAN, P.B., GOTTFERT, M., SHARMA, A y GERHOLD, D. (1.991), *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA*, **88**, 637-641.
- [311] SALMINEN, S.O. Y STREETER, J.G. (1.986), *Plant Physiol.*, **81**, 538-541.
- [312] SALMINEN, S.O. y STREETER, J.G. (1.987), *J. Bacteriol.*, **169**, 495-499.
- [313] SALMINEN, S.O. y STREETER, J.G. (1.987), *Plant Physiol.*, **83**, 535-540.
- [314] SAN FRANCISCO, M.J.D. y JACOBSON, G.R. (1.986), *FEMS Microbiol. Lett.*, **35**, 71-74.
- [315] SANDERS, R.E., CARLSON, R.W. y ALBERSHEIM, P. (1.978), *Nature*, **271**, 240-242.
- [316] SAROSO, S., DILWORTH, M.J. y GLENN, A.R. (1.986), *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 243-249.
- [317] SAROSO, S., GLENN, A.R. y DILWORTH, M.J. (1.984), *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1804-1809.
- [318] SCHMIDT, J., JOHN, M. KONDOROSI, E., KONDOROSI, A. y WEINEKE, U. (1.984), *EMBO J.*, **3**, 1705-1711.
- [319] SCHUBERT, K.R. (1.981), *Plant Physiol.*, **68**, 1115-1122.
- [320] SCHUBERT, K.R. (1.986), *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **37**, 539-574.
- [321] SCHUBERT, K.R. y COKER, G.T. (1.982), *Adv. Chem. Ser.*, **197**, 317-339.
- [322] SCHULTZE, M., QUICLET-SIRE, G., KONDOROSI, E., VIRELIZIER, H., GLUSHKA, J.N., ENDRE, G., GERO, S.D. y KONDOROSI, A. (1.992), *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA*, **89**, 192-196.
- [323] SENIOR, P.J., BEECH, G.A., RITCHIE, G.A.F. y DAWES, E.A. (1.972), *Biochem. J.*, **128**, 1193-1201.
- [324] SEVILLANO, F. y RODRIGUEZ-BARRUECO, C. (1.987), en: *Avances en la Biología de la Fijación Simbiótica del Nitrógeno Atmosférico* (megías Guijo, M. y Ruiz Berraquero, F., eds). Pub. Univ. Sevilla. Sevilla.
- [325] SHAH, V.K. y BRILL, W.J. (1.977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3249-3253.
- [326] SHAH, V.K., STACEY, G. y BRILL, W.J. (1.983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 12064-12068.
- [327] SHEARMAN, C.A., ROSSEN, L., JOHNSTON, A.W.B. y DOWNIE, J.A. (1.986), *EMBO J.*, **5**, 647-652.
- [328] SHELPE, B.J. y ATKINS, C.A. (1.984), *Plant Sci. Lett.*, **36**, 225-230.
- [329] SHELPE, B.J., ATKINS, C.A., STORER, P.J. y CANVIN, D.T. (1.983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **224**, 429-441.
- [330] SINGH, V. y LODHA, M.L. (1.989), *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **184**, 377-385.
- [331] SMITH, B.E., BISHOP, P.E., DIXON, R.A., EADY, R.R., FILLER, W.A., LOWE, D.J., RICHARDS, A.J.M., THOMSON, A.J., THORNELEY, R.N.F. y POSTGATE, J.R. (1.985), en: *Nitrogen Fixation Research Progress* (H.J. Evans, P.J. Botomley y W.E. Newton, eds.). Martinus Nijhoff Pub. Dordrecht.
- [332] SMITH, B.E., EADY, R.R., LOWE, D.J. y GORMAL, C. (1.988), *Biochem. J.*, **250**, 299-302.
- [333] SMITH, B.E., LOWE, D.J. Y BRAY, R.C. (1.972), *Biochem. J.*, **130**, 641-643.
- [334] SMITH, B.E., LOWE, D.J. y BRAY, R.C. (1.973), *Biochem. J.*, **135**, 331-341.
- [335] SPAINK, H.P., SHEELEY, D.M., VAN BRUSSEL, A.A.N., GLUSHKA, J., YORK, W.S., TAK, T.,

- GEIGER, O., KENNEDY, E.P., REINHOLD, V.N. y LUGTENBERG, B.J.J. (1.991), *Nature*, **354**, 125-130.
- [336] SPAINK, H.P., WIJFFELMAN, C.A., OKKER, R.J.H y LUGTENBERG, B.J.J. (1.989), *Plant Mol. Biol.*, **12**, 59-73.
- [337] ST JOHN, R.T., JOHNSTON, H.M., SEIDMAN, C., GARFINKEL, D., GORDON, J.K., SHAH, W.R. y BRILL, W.J. (1.975), *J. Bacteriol.*, **121**, 759-765.
- [338] STACEY, G., GRESSHOFF, P.M. y KEEN, N.T. (1.992), *Plant Cell*, **###**, 1173-1179.
- [339] STACHEL, S.E., MESSENS, E., VAN MONTAGU, M. y ZAMBRYSKI, P. (1.985), *Nature*, **318**, 624-629.
- [340] STREETER, J.G. (1.972), *Agron. J.*, **64**, 311-314.
- [341] STREETER, J.G. (1.981), *Planta*, **155**, 112-115.
- [342] STREETER, J.G. (1.987), *Plant Physiol.*, **85**, 768-773.
- [343] STREETER, J.G. y SALMINEN, S.O. (1.988), en: *Nitrogen fixation: hundred years after* (H. Bothe, F.J. de Bruijn y W.E. Newton, eds). Gustav Fischer. Stuttgart.
- [344] SUGANUMA, N. YAMAMOTO, Y. (1.987), *Soil Sci. Plant Nutr.*, **33**, 79-91.
- [345] SUTTON, W.D. y PATTERSON, A.D. (1.979), *Pl. Sci. Lett.*, **16**, 377-385.
- [346] TAJIMA, S., KIMURA, I. Y SASAHARA, H. (1.986), *Agric. Biol., Chem.*, **50**, 1009-1014.
- [347] TAJIMA, S. y LARUE, T.A. (1.982), *Plant Physiol.*, **70**, 388-392.
- [348] TAJIMA, S. y YAMAMOTO, Y. (1.975), *Plant Cell Physiol.*, **16**, 271-282.
- [349] THOMAS, R.J., FELLER, U., ERISMANN, K.H. (1.980), *J. Exp. Bot.*, **31**, 409-417.
- [350] THOMAS, R.J. y SCHRADER, L.E. (1.981), *Phytochemistry*, **20**, 409-417.
- [351] THOMPSON, J.F. (1.980), en: *The Biochemistry of Plants* (B.J. Mifflin, ed.), vol 5. Academic Press. New York.
- [352] THORNELEY, R.N.F. y LOWE, D.J. (1.985), en: *Molybdenum enzymes* (T.G. Spiro, eds.). John Wiley and Sons. New York.
- [353] TOROK, I., KONDOROSI, E., STEPKOWSKI, T., POSFAI, J. y KONDOROSI, A. (1.984), *Nucleic Acids Res.*, **12**, 9509-9524.
- [354] TRIPLETT, E.W., BLEVINS, D.G. y RANDALL, D.D. (1.980), *Plant Physiol.*, **65**, 1203-1206.
- [355] TRIPLETT, E.W. y SADOWSKY, M.J. (1.992), *Annu. Rev. Microbiol.*, **46**, 399-428.
- [356] TRUCHET, G. y COULOMB, P. (1.973), *J. Ultrastr. Res.*, **43**, 36-57.
- [357] TRUCHET, G., MICHEL, M. y DENARIÉ, J. (1.980), *Differentiation*, **16**, 163-172.
- [358] TRUCHET, G., ROCHE, P., LEROUGE, P. VASSE, J., CAMUT, S. DE BILLY, F., PROMÉ, J.C. y DENARIE, J. (1.991), *Nature*, **351**, 670-673.
- [359] TSIEN, H.C., CAIN, P.S. y SCHMIDT, E.L. (1.977), *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 854-856.
- [360] TUBB, R.S. (1.976), *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 483-488.
- [361] TUBB, R.S. y POSTGATE, J.R. (1.973), *J. Gen. Microbiol.*, **79**, 103-117.
- [362] UDVARDI, M.K. y DAY, D.A. (1.988), en: *Nitrogen fixation: hundred years after* (H. Bothe, F.J. de Bruijn y W.E. Newton, eds). Gustav Fischer. Stuttgart.
- [363] UDVARDI, M.K. y DAY, D.A. (1.989), *Plant Physiol.*, **90**, 982-987.
- [364] UDVARDI, M.K. y DAY, D.A. (1.990), *Plant Physiol.*, **94**, 71-76.
- [365] UDVARDI, M.K., OU YANG, L.J., YOUNG, S. y DAY, D.A. (1.990), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **3**, 334-340.
- [366] UDVARDI, M.K., PRICE, G.D., GRESSHOFF, P.M. y DAY, D.A. (1.988), *FEBS Lett.*, **231**, 36-40.
- [367] UDVARDI, M.K., SALOM, C.L. y DAY, D.A. (1.988), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **1**, 250-254.
- [368] VAIRINHOS, F., BHANDARI, B. y NICHOLAS, D.J.D. (1.983), *Planta*, **159**, 207-215.
- [369] VANCE, C.P. (1.990), en: *The biochemistry of plants: an advanced treatise* (P.K. Stumpf y E.E. Conn, eds) vol 16. Academic Press. New York.
- [370] VANCE, C.P., BOYLAN, K.L.M., MAWXWELL, C.A., HEICHEL, G.H. y HARDMAN, L.L. (1.985), *Plant Physiol.*, **78**, 774-778.
- [371] VANCE, C.P. y HEICHEL, G.H. (1.991), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42**, 373-392.
- [372] VERMA, D.P.S. y LONG, S. (1.983), *Int. Rev. Citol. suppl.* **14**, 211-245.
- [373] WALKER-SIMMONS, M. y RYAN, C.A. (1.977), *Plant Physiol.*, **60**, 61-63.
- [374] WALSH, K.B., NG, B.H. y CHANDLER, G.E. (1.984), *Plant Soil.*, **81**, 291-293.
- [375] WALSH, K.B., VESSEY, J.K. y LAZZELL, D.B. (1.987), *Plant Physiol.*, **85**, 137-144.
- [376] WATERS, J.K., KARR, D.B. y EMERICH, D.W. (1.985), *Biochemistry*, **24**, 6479-6486.
- [377] WERNER, D., MÖRSCHER, E., GARBERS, C., BASSARAB, S. y MELLOR, R.B. (1.988), *Planta*, **174**, 263-270.
- [378] WERNER, D., MÖRSCHER, E., KORT, R., MELLOR, R.B. y BASSARAB, S. (1.984), *Planta*, **162**, 8-16.
- [379] WHATLEY, J.M., JOHN, P. y WHATLEY, F.R. (1.979), *Proc. R. Soc. London, series B*, **204**, 165-187.

- [380] WIJFFELMAN, C.A., SPAINK, H., ZAAT, B., OKKER, R. y PEES, E. (1.986), en: *3rd Int. Symp. Mol. Genet. Plant-Microbe Interactions*. McGill Univ. Press. Montreal (Abstr. p154).
- [381] WINTER, H.C., SU, T.Z. y DEKKER, E.E. (1.983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **111**, 484-489.
- [382] WITTY, F.J.F. y MINCHIN, F.R. (1.990), en: *Nitrogen fixation: achievements and objectives* (P.M. Gresshoff, G. Stacey y W.E. Newton, eds.). Chapman and Hall. New York.
- [383] WITTY, F.J.F., MINCHIN, F.R., SKOT, L. y SHEEHY, J.E. (1.986), *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.*, **3**, 275-314.
- [384] WOLPERT, J.S. y ALBERSHEIM, P. (1.976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 729-737.
- [385] WONG, P.P. Y EVANS, H.J. (1.971), *Plant Physiol.*, **47**, 750-755.
- [386] WOO, K.C., ATKINS, C.A. y PATE, J.S. (1.980), *Plant Physiol.*, **66**, 735-739.
- [387] WOO, K.C., ATKINS, C.A. y PATE, J.S. (1.981), *Plant Physiol.*, **67**, 1156-1160.
- [388] YANG, L.J.O., UDVARDI, M.K. y DAY, D.A. (1.990), *Planta*, **182**, 437-444.
- [389] YOUNG, J.P.W. y JOHNSTON, A.W.B. (1.989), *Trends Ecol. Evol.*, **4**, 331-349.
- [390] ZAAT, S.A.J., WIJFFELMAN, C.A., MULDER, I.H.M., VAN BRUSSEL, A.A.N. y LUGTENBERG, B.J.J. (1.988), *Plant Physiol.*, **86**, 1298-1303.
- [391] ZAAT, S.A.J., SCHRIPSEMA, J. WIJFFELMAN, C.A., VAN BRUSSEL, A.A.N. y LUGTENBERG, B.J.J. (1.989), *Plant Mol. Biol.*, **13**, 175-188.
- [392] ZUMFT, W.G. y MORTENSON, L.E. (1.975), *Biochim. Biophys. Acta*, **416**, 1-52.